

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**DILAMARA RIVA SCHARF**

**IDENTIFICAÇÃO DE CROMENOS, NAFTOQUINONAS E OUTROS CONSTITUINTES DE  
*Sinningia allagophylla* (GESNERIACEAE) E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES  
CITOTÓXICA, ANTI-INFLAMATÓRIA, ANALGÉSICA E LARVICIDA**

**CURITIBA**

**2014**

**DILAMARA RIVA SCHARF**

**IDENTIFICAÇÃO DE CROMENOS, NAFTOQUINONAS E OUTROS CONSTITUINTES DE  
*Sinningia allagophylla* (GESNERIACEAE) E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES  
CITOTÓXICA, ANTI-INFLAMATÓRIA, ANALGÉSICA E LARVICIDA**

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Química, Curso de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Élide Alves Stefanello.

Projeto realizado com auxílio financeiro do CNPq (processo nº. 472-392/2011-5) e autorização de acesso ao patrimônio genético (nº. 01088/2012-5).

**CURITIBA**

**2014**

## *Dedicatória*

*Dedico esta tese ao meu grande amor Denis Marcelo, pelo apoio incondicional*

*em todos os momentos. O amor é maravilhoso!*

*Aos meus pais Valdemiro e Graci pelo amor e por seus ensinamentos.*

## Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida! “Não temas porque eu sou contigo; eu te fortaleço e te ajudo.” Isaías 41. 10.

Aos meus pais Valdemiro e Graci por simplesmente tudo, pelo exemplo de humildade e fé. E as minhas irmãs pelas palavras de incentivo.

Ao melhor presente da minha vida, meu amor Denis, pelo amor, paciência, incentivo, amizade... te amo!

A grande família Scharf....de todo meu coração.

Muito especialmente a minha orientadora Dra. Maria Éli da Alves Stefanello, aprendi muito mais que conhecimentos químicos, meu eterno reconhecimento, carinho e agradecimento.

Aos meus amigos do RS e SC, que moram no meu coração.

As minhas amigas e colegas: Maria Helena, Regiane e Thalita por acreditarem e fazerem parte da finalização de mais esta etapa da minha vida.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais – UFPR e Laboratório de Cromatografia – FURB.

A todos os Professores do Departamento de Química da UFPR por seus ensinamentos.

Agradeço aos Professores Andersson Barison, Francisco de Assis Marques e Claudiney Soares Cordeiro por suas contribuições no exame de qualificação.

Agradeço aos Professores Marcos José Salvador, Guilherme Lanzi Sassaki, Andersson Barison e Francisco de Assis Marques por aceitarem fazer parte da banca examinadora deste trabalho. Meu respeito, meu reconhecimento, meu muito obrigado!

Aos Professores que dispuseram de seu tempo para realizar os ensaios biológicos, cromatográficos e espectrométricos: Marcos José Salvador, Marcos Eberlin, Andersson Barison, Edesio Luiz Simionatto, Aleksander Roberto Zampronio, Lauro M. Souza, João Ernesto de Carvalho e Mário Antonio Navarro.

A Clarice B. Poliquesi pela coleta e identificação da *Sinningia allagophylla*.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

Todos sabem que um trabalho como este não se faz sozinho, então agradeço a todos com o mesmo sentimento.

Afla, Ômega... princípio e fim, sim Ele é...  
sim Ele é... Lírio dos vales, estrela da  
manhã, para sempre cantarei o Seu  
amor!!! A Ele a glória, à Ele o louvor,  
a Ele o domínio... Ele é o Senhor.

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS .....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTA DE ESPECTROS .....</b>	<b>xvi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xxi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xxii</b>
<b>SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....</b>	<b>xxiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Família Gesneriaceae .....	2
1.2. Gênero <i>Sinningia</i> .....	3
1.3. <i>Sinningia allagophylla</i> .....	7
1.4. Atividade citotóxica.....	8
1.5. Atividade analgésica e anti-inflamatória .....	9
1.6. Atividade larvícida .....	11
<b>2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3. ESTUDO FITOQUÍMICO .....</b>	<b>12</b>
3.1. Materiais e Métodos .....	12
3.1.1. Procedimentos gerais.....	12
3.1.2. Material vegetal.....	14
3.1.3. Preparação dos extratos e frações.....	14
3.1.3.1. Isolamento dos constituintes da fração hexânica (SA-1) .....	14
3.1.3.2. Isolamento dos constituintes da fração em diclorometano (SA-2) .....	17
3.1.3.3. Isolamento dos constituintes da fração em acetato de etila (SA-3).....	19
3.1.4. Dados físicos e espectrométricos das substâncias isoladas.....	23
3.2. Resultados e Discussão .....	26
3.2.1. Identificação de <b>1</b> e determinação estrutural de <b>2</b> , <b>3</b> e <b>4</b> – Cromenos .....	26
3.2.2. Determinação estrutural de <b>5</b> , <b>6</b> e <b>7</b> - Cromenos diméricos .....	44
3.2.3. Identificação de <b>8</b> - Antraquinona .....	59
3.2.4. Identificação de <b>9</b> , <b>10</b> , <b>11</b> e <b>12</b> e determinação estrutural de <b>13</b> , <b>14</b> e <b>15</b> – Naftoquinonas e hidronaftoquinonas .....	63
3.2.5. Identificação de <b>16</b> – Iridóide.....	94

3.2.6. Identificação de <b>17</b> , <b>18</b> e <b>19</b> – Sesquiterpenos .....	100
3.2.7. Identificação de <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> e <b>23</b> – Esteróides .....	106
<b>4. BIOSÍNTESE.....</b>	<b>114</b>
4.1. Quinonas.....	114
4.2. Cromenos .....	117
<b>5. ENSAIOS BIOLÓGICOS .....</b>	<b>121</b>
5.1. Avaliação da atividade antiproliferativa.....	121
5.1.1. Materiais e métodos .....	121
5.1.2. Resultados e discussão.....	121
5.2. Avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória.....	125
5.2.1. Materiais e métodos .....	125
5.2.2. Resultados e discussão.....	126
5.3. Avaliação da atividade larvícida .....	127
5.3.1. Materiais e métodos .....	127
5.3.2. Resultados e discussão.....	128
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>130</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>130</b>



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG-DIC	Cromatografia gasosa com detector de ionização por chama
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CL	Concentração letal
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLV	Cromatografia líquida sob vácuo
$\delta$	Deslocamento químico
<i>d</i>	Dupleto
DC	Dicroísmo circular
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
<i>dl</i>	Dupleto largo
<i>ddq</i>	Duplo duplo quarteto
<i>dq</i>	Duplo quarteto
<i>dt</i>	Duplo tripleto
DEPT-135	Intensificação dos níveis através da transferência de polarização sem efeito de distorção
EM	Espectrometria de massas
ESI	Ionização por <i>spray</i> de elétrons
HMBC	Correlação heteronuclear a múltiplas ligações

HSQC	Correlação heteronuclear a uma única ligação
IR	Índice de retenção
$J$	Constante de acoplamento
LD	Longa distância
$m$	Multiplete
$m/z$	Relação massa/carga
OMT	O-metiltransferase
NOE	Efeito Nuclear Overhauser
$q$	Quarteto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$	Ressonância Magnética Nuclear de carbono desacoplado de hidrogênio
$s$	Simpleto
$s/$	Simpleto largo
$t$	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
TR	Tempo de retenção
$[\alpha]_{\text{D}}$	Rotação óptica

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b>	Substâncias isoladas de <i>Sinningia</i> spp	05
<b>Tabela 02</b>	Agrupamento das frações da coluna de <b>SA1-1</b>	15
<b>Tabela 03</b>	Agrupamento das subfrações da coluna de <b>SA1-17</b>	16
<b>Tabela 04</b>	Agrupamento das frações da coluna de <b>SA-2</b>	17
<b>Tabela 05</b>	Agrupamento das frações da coluna de <b>SA2-2</b>	18
<b>Tabela 06</b>	Agrupamento das frações da coluna de <b>SA3-2</b>	20
<b>Tabela 07</b>	Substâncias isoladas de <i>Sinningia allagophylla</i>	26
<b>Tabela 08</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$ de <b>1</b> , <b>2</b> e <b>3</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	40
<b>Tabela 09</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$ de <b>4</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	44
<b>Tabela 10</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$ de <b>5</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	49
<b>Tabela 11</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$ de <b>6</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 e 600 MHz)	53
<b>Tabela 12</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$ de <b>7</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 e 600 MHz)	58
<b>Tabela 13</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$ de <b>8</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	62
<b>Tabela 14</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$ de <b>9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	67
<b>Tabela 15</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$ de <b>10</b> , <b>11</b> e <b>12</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	80
<b>Tabela 16</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$ de <b>13</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	85
<b>Tabela 17</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$ de <b>14</b> e <b>15</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	93
<b>Tabela 18</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$ de <b>16</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	100
<b>Tabela 19</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) de <b>17</b>	105
<b>Tabela 20</b>	Principais dados de RMN de $^1\text{H}$ de <b>20</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	113
<b>Tabela 21</b>	Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>20</b> e <b>22</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	113
<b>Tabela 22</b>	Atividade antiproliferativa do extrato etanólico, frações e substâncias de <i>S. allagophylla</i>	123

<b>Tabela 23</b>	Atividade antiproliferativa (TGI em $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) das substâncias isoladas <b>1</b> , <b>2</b> e <b>9</b>	124
<b>Tabela 24</b>	Atividade larvícida da substância isolada <b>2</b>	129

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	Espécies de Gesneriaceae. <b>A:</b> <i>Sinningia speciosa</i> (Gloxínia). <b>B:</b> <i>Saintpaulia ionantha</i> (Violeta africana)	03
<b>Figura 02</b>	Distribuição geográfica de espécies do gênero <i>Sinningia</i> no Brasil. A cor branca indica ausência de registro naquele estado	04
<b>Figura 03</b>	Estruturas das substâncias isoladas de <i>Sinningia</i> spp	06
<b>Figura 04</b>	Fotos de <i>Sinningia allagophylla</i> mostrando o seu ciclo de crescimento	07
<b>Figura 05</b>	Estruturas das substâncias vimblastina (A), vincristina (B) e paclitaxel (C)	09
<b>Figura 06</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>1</b>	31
<b>Figura 07</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>2</b>	36
<b>Figura 08</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>3</b>	39
<b>Figura 09</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>4</b>	43
<b>Figura 10</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>5</b>	48
<b>Figura 11</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>6</b>	53
<b>Figura 12</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>7</b>	58
<b>Figura 13</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>8</b>	63
<b>Figura 14</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>9</b>	66
<b>Figura 15</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>10</b>	72

<b>Figura 16</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>11</b>	76
<b>Figura 17</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>12</b>	79
<b>Figura 18</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>13</b>	85
<b>Figura 19</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>14 e 15</b>	91
<b>Figura 20</b>	Principais correlações observadas no Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>16</b>	99
<b>Figura 21</b>	Cromatograma de <b>17, 18 e 19</b>	101
<b>Figura 22</b>	Formação dos possíveis precursores da biossíntese de <b>13, 14 e 15</b>	115
<b>Figura 23</b>	Proposta de biossíntese de <b>13</b>	116
<b>Figura 24</b>	Proposta de biossíntese de <b>14 e 15</b>	116
<b>Figura 25</b>	Formação do possível precursor da biossíntese das substâncias <b>1-7</b>	117
<b>Figura 26</b>	Proposta de biossíntese para as substâncias <b>1, 2, 3 e 4</b>	118
<b>Figura 27</b>	Proposta de biossíntese para a substância <b>5</b>	119
<b>Figura 28</b>	Proposta de biossíntese para as substâncias <b>6 e 7</b>	120

**LISTA DE ESQUEMAS**

<b>Esquema 01</b>	Extração e fracionamento dos tubérculos de <i>Sinningia allagophylla</i>	15
<b>Esquema 02</b>	Fracionamento da fração <b>SA-1</b>	21
<b>Esquema 03</b>	Fracionamento da fração <b>SA-2</b>	22
<b>Esquema 04</b>	Fracionamento da fração <b>SA-3</b>	20

## LISTA DE ESPECTROS

<b>E01</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>1</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	27
<b>E02</b>	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>1</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	28
<b>E03</b>	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>1</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	28
<b>E04</b>	Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>1</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	29
<b>E05</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>1</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	29
<b>E06</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>1</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	30
<b>E07</b>	Espectro de massas de alta resolução da substância <b>2</b>	32
<b>E08</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	32
<b>E09</b>	Ampliação da região das metoxilas do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	33
<b>E10</b>	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	33
<b>E11</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	34
<b>E12</b>	Espectro de RMN de DEPT-135 de <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	34
<b>E13</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	35
<b>E14</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	35
<b>E15</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>3</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	37
<b>E16</b>	Comparação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ de <b>2</b> e <b>3</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	37
<b>E17</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>3</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	38
<b>E18</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>3</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	38
<b>E19</b>	Espectro de massas de alta resolução da substância <b>4</b>	41
<b>E 20</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>4</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	41



<b>E21</b>	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos e olefínicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>4</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	42
<b>E22</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>4</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	42
<b>E23</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>4</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	43
<b>E24</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>5</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	46
<b>E25</b>	Ampliação da região dos hidrogênios metílicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>5</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	46
<b>E26</b>	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>5</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	47
<b>E27</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>5</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	47
<b>E28</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>5</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	48
<b>E29</b>	Espectro de massas de alta resolução da substância <b>6</b>	50
<b>E30</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>6</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)	51
<b>E31</b>	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos e olefínicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>6</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)	51
<b>E32</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>6</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	52
<b>E33</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>6</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	52
<b>E34</b>	Espectro de massas de alta resolução da substância <b>7</b>	55
<b>E35</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>7</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)	55
<b>E36</b>	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos e olefínicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>7</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)	56
<b>E37</b>	Ampliação da região do hidrogênio metínico do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>7</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)	56
<b>E38</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>7</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	57
<b>E39</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>7</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	57
<b>E40</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>8</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	60
<b>E41</b>	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>8</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	60

<b>E42</b>	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>8</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	61
<b>E43</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>8</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	61
<b>E44</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>8</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	62
<b>E45</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	64
<b>E46</b>	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos e do grupo hidroxila do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	64
<b>E47</b>	Ampliação da região dos hidrogênios do grupo 1,1-dimetilalila do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	65
<b>E48</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	65
<b>E49</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>9</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	66
<b>E50</b>	Comparação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ de <b>10</b> , <b>11</b> e <b>12</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	68
<b>E51</b>	Ampliação da região dos hidrogênios do grupo 2,3-diidro-2,3,3-trimetilfurano do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>10</b> , <b>11</b> e <b>12</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	69
<b>E52</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>10</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	70
<b>E53</b>	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>10</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	70
<b>E54</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>10</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	71
<b>E55</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>10</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	71
<b>E56</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	73
<b>E57</b>	Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	74
<b>E58</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de <b>11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	74
<b>E59</b>	Espectro de RMN de DEPT-135 de <b>11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	75
<b>E60</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	75
<b>E61</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>11</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	76
<b>E62</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>12</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	77
<b>E63</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de <b>12</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	78

<b>E64</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>12</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	78
<b>E65</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>12</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	79
<b>E66</b>	Espectro de massas de alta resolução da substância <b>13</b>	82
<b>E67</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>13</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	82
<b>E68</b>	Comparação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ de <b>12</b> e <b>13</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	83
<b>E69</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>13</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	84
<b>E70</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>13</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	84
<b>E71</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>14</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	87
<b>E72</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>15</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	88
<b>E73</b>	Comparação dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ de <b>14</b> e <b>15</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	89
<b>E74</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>14</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	88
<b>E75</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>14</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	90
<b>E76</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>15</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	90
<b>E77</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>15</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	91
<b>E78</b>	Espectro de massas de alta resolução da substância <b>14</b>	92
<b>E79</b>	Espectro de massas de alta resolução da substância <b>15</b>	92
<b>E80</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>16</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	95
<b>E81</b>	Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>16</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	95
<b>E82</b>	Ampliação da região dos hidrogênio oximetínico do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>16</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	96
<b>E83</b>	Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>16</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	96
<b>E84</b>	Ampliação da região dos hidrogênios metilênicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>16</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	97
<b>E85</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de <b>16</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	97
<b>E86</b>	Espectro de RMN de DEPT-135 de <b>16</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	98

<b>E87</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>16</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	98
<b>E88</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>16</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	99
<b>E89</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>17</b> , <b>18</b> e <b>19</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	102
<b>E90</b>	Ampliação da região dos hidrogênios metílicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>17</b> , <b>18</b> e <b>19</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	102
<b>E91</b>	Ampliação da região dos hidrogênios metilênicos e metínicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>17</b> , <b>18</b> e <b>19</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	103
<b>E92</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de <b>17</b> , <b>18</b> e <b>19</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	103
<b>E93</b>	Espectro de RMN de DEPT-135 de <b>17</b> , <b>18</b> e <b>19</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	104
<b>E94</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>17</b> , <b>18</b> e <b>19</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	104
<b>E95</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>17</b> , <b>18</b> e <b>19</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	105
<b>E96</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> e <b>23</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	108
<b>E97</b>	Ampliação da região dos hidrogênios metílicos e metilênicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> e <b>23</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	108
<b>E98</b>	Ampliação da região do hidrogênio oximetínico do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> e <b>23</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	109
<b>E99</b>	Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> e <b>23</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	109
<b>E100</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> e <b>23</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	110
<b>E101</b>	Ampliação da região dos carbonos olefínicos do espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> e <b>23</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	110
<b>E102</b>	Espectro de RMN de DEPT-135 de <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> e <b>23</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)	111
<b>E103</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação de <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> e <b>23</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	111
<b>E104</b>	Mapa de correlação $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância de <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> e <b>23</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	112
<b>E105</b>	Espectro de massas de alta resolução das substâncias <b>20</b> , <b>21</b> , <b>22</b> e <b>23</b>	112

## RESUMO

A família Gesneriaceae compreende cerca de 150 gêneros e 3000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo inteiro. No Brasil está representada por 28 gêneros e 215 espécies. O gênero *Sinningia* compreende 68 espécies, das quais 67 são encontradas em território brasileiro. Os estudos químicos já realizados revelam que as espécies de *Sinningia* contêm principalmente antraquinonas e terpenos. *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler, é uma erva anual, com tubérculo perene, encontrada nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste do Brasil, e também na Argentina e no Paraguai. É considerada medicinal, sendo usada na medicina popular como tônico, febrífugo, depurativo e diurético. O presente trabalho descreve, pela primeira vez, o isolamento e identificação de seus constituintes químicos e a avaliação das atividades citotóxica, analgésica, anti-inflamatória e larvicida de extratos e substâncias isoladas.

Os tubérculos secos de *S. allagophylla* foram extraídos com etanol. O extrato etanólico foi fracionado por partição com solventes e, posteriormente por cromatografia. As substâncias puras obtidas foram identificadas por técnicas espectrométricas (massas, RMN). Desse modo foram identificadas 23 substâncias: lapachenol (**1**), 8-metoxilapachenol (**2**), 8-metoxi-12-hidroxilapachenol (**3**), allagophyllolídeo (**4**), allagophyllina A (**5**), allagophyllina B (**6**), allagophyllina C (**7**), tectoquinona (**8**), dunniol (**9**),  $\alpha$ -dunniona (**10**), 8-hidroxidunniona (**11**), dunniona (**12**), allagophyllona (**13**), aggregatina E (**14**), 6-metoxiaggregatina E (**15**), halleridona (**16**), cedrol (**17**),  $\alpha$ -muurolol (**18**), 8-cedren-13-ol (**19**), oleato de sitosterila (**20**), linoleato de sitosterila (**21**), oleato de estigmasterila (**22**) e linoleato de estigmasterila (**23**). As substâncias **2-7** e **13-15** são inéditas.

O extrato etanólico apresentou atividade citotóxica, analgésica e anti-inflamatória. A atividade citotóxica foi avaliada *in vitro* contra várias linhagens de células tumorais humanas, sendo **9** identificada como a substância mais ativa. Esta naftoquinona inibiu totalmente o crescimento das linhagens de células tumorais de leucemia (K562), glioma (U251), mama (MCF-7), ovário (OVCAR-3) e ovário resistente à múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES) em concentrações de 1,14-6,88  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (4,5-28  $\mu\text{M}$ ). As atividades analgésica e anti-inflamatória foram avaliadas *in vivo*, em camundongos. A substância **2** foi ativa na concentração de 1,8  $\text{mg kg}^{-1}$  (6,7  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ ), quando administrada por via oral. Essa substância também apresentou atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*, com um valor de  $\text{CL}_{50} = 7,41 \mu\text{g mL}^{-1}$  (27,4  $\mu\text{M}$ ) após 24 h.

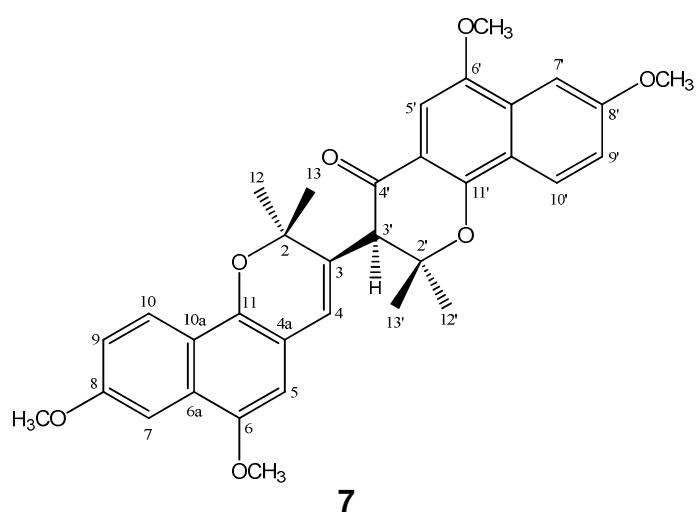
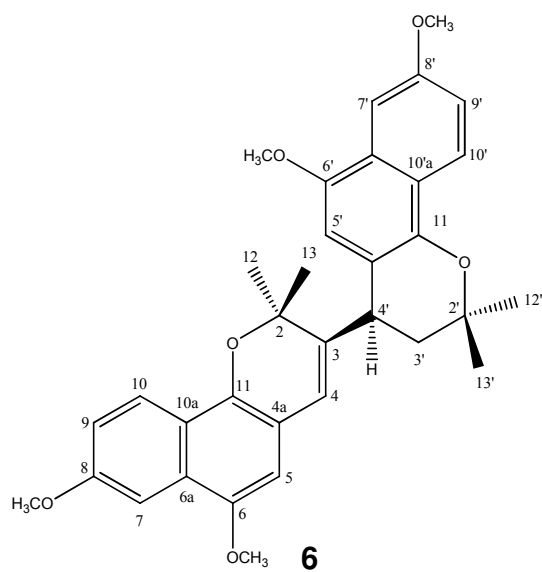
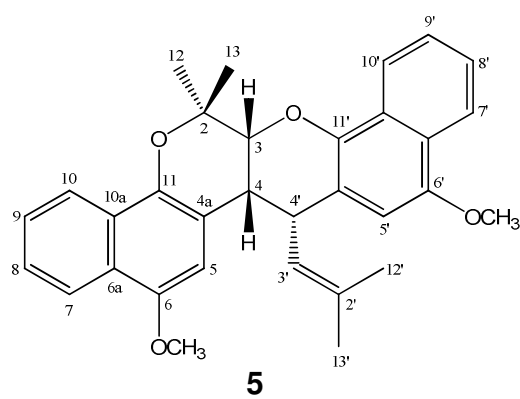
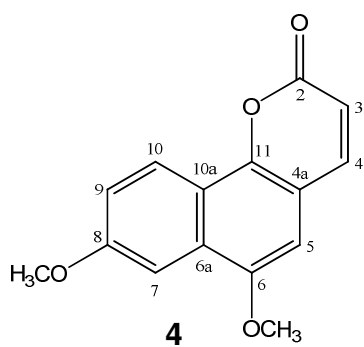
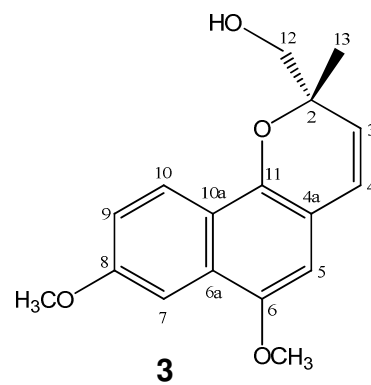
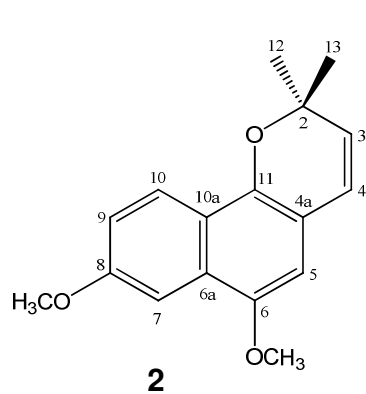
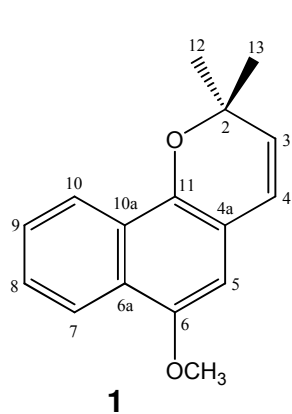
## ABSTRACT

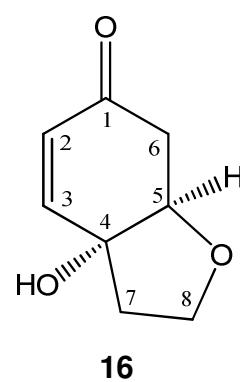
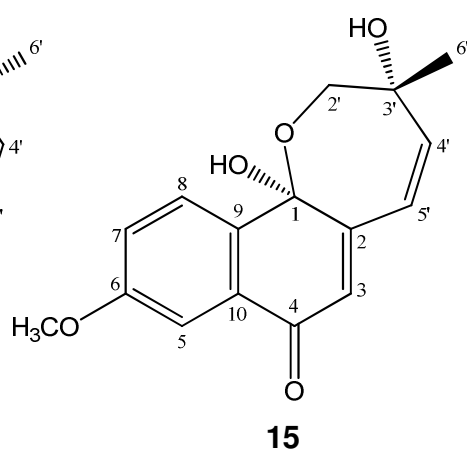
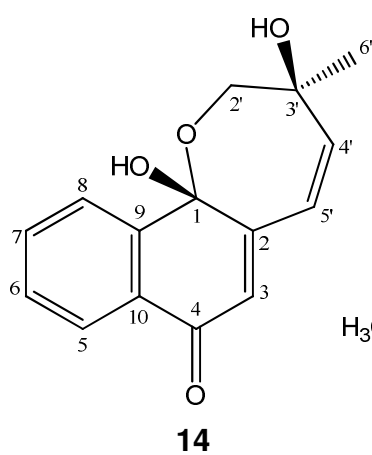
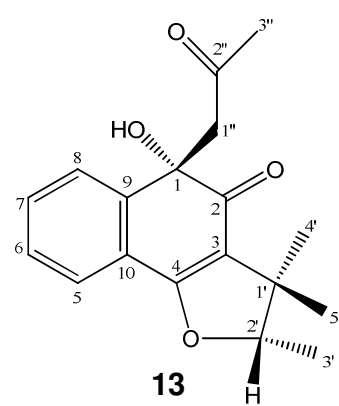
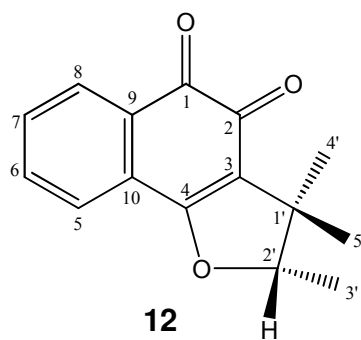
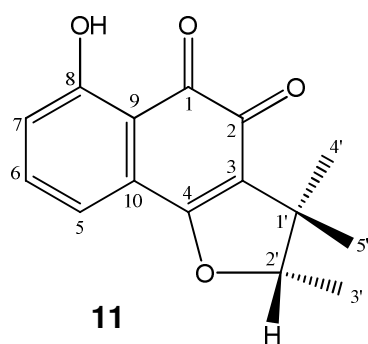
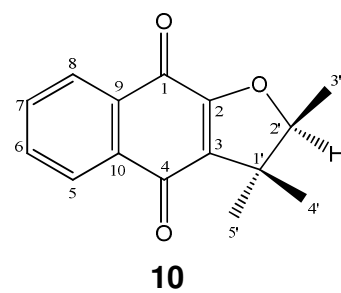
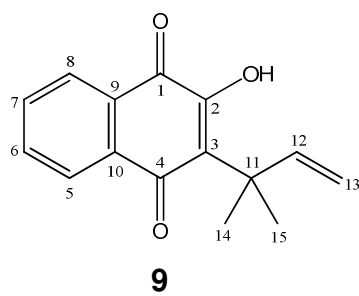
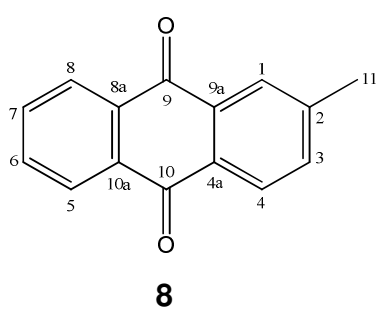
The family Gesneriaceae comprises about 150 genus and 3000 species, distributed in the tropics and subtropics around the world. In Brazil the family is represented by 28 genera and 215 species. The genus *Sinningia* comprises 68 species, of which 67 are found in Brazil. Previous chemical studies reveal that *Sinningia* species produce mainly anthraquinones and terpenes. *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler is an annual herb, with perennial tubers, growing in the Mid-Western, Southeastern and Southern regions of Brazil, besides Argentina and Paraguay. This plant is considered medicinal, being used in the folk medicine as tonic, febrifuge, depurative and diuretic. This work describes, for the first time, the isolation and identification of chemical constituents and evaluation of cytotoxic, analgesic, anti-inflammatory and larvicidal activities of extracts and pure compounds of *S. allagophylla*.

Dried tubers were extracted with ethanol. The extract was fractionated by partition with solvents and chromatographic techniques. Pure compounds were identified by spectrometric techniques (mass, NMR). This procedure resulted in the identification of 23 compounds: lapachenol (**1**), 8-methoxylapachenol (**2**), 8-methoxy-12-hydroxylapachenol (**3**), allagophyllolide (**4**), allagophyllin A (**5**), allagophyllin B (**6**), allagophyllin C (**7**), tectoquinone (**8**), dunnol (**9**),  $\alpha$ -dunnione (**10**), 8-hydroxydunnione (**11**), dunnione (**12**), allagophyllone (**13**), aggregatin E (**14**), 6-methoxyaggregatin E (**15**), halleridone (**16**), cedrol (**17**),  $\alpha$ -muurolol (**18**), 8-cedren-13-ol (**19**), sitosteryl oleate (**20**), sitosteryl linoleate (**21**), stigmasteryl oleate (**22**) and stigmasteryl linoleate (**23**). Compounds **2-7** and **13-15** are new.

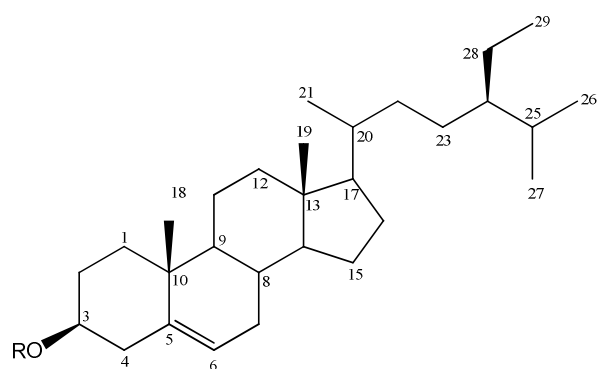
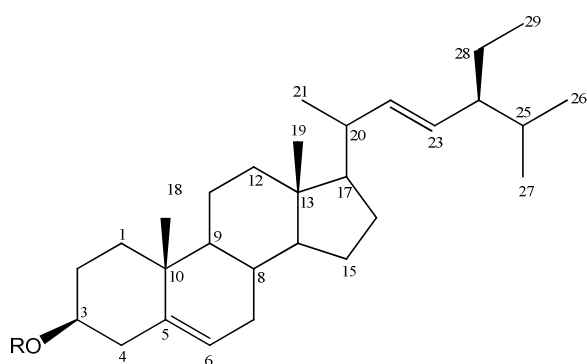
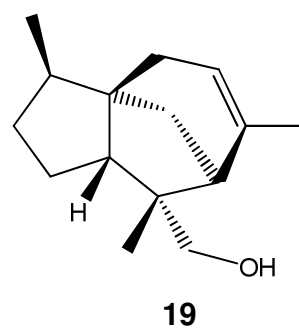
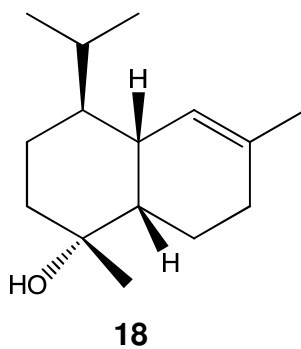
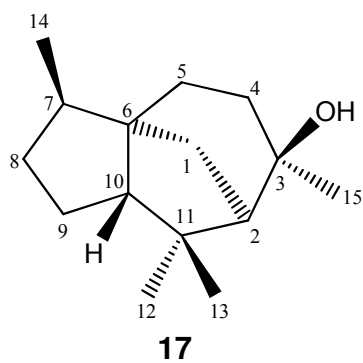
The ethanol extract showed cytotoxic, analgesic and anti-inflammatory activities. The cytotoxic activity was evaluated *in vitro* against several human tumor cell lines, and **9** was identified as the most active compound. This naphtoquinone inhibited totally the growth of leukemia (K562), gliome (U251), mama (MCF-7), ovarian (OVCAR-3), and drug-resistant ovarian cell lines with concentrations of 1.14-6.88  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (4.5-28  $\mu\text{M}$ ). The analgesic and anti-inflammatory activities were evaluated *in vivo*, using mice. Compound **2** showed activity in the concentration of 1.8  $\text{mg kg}^{-1}$  (6.7  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ ), by *via* oral. This compound also exhibited larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae, with  $\text{LC}_{50} = 7.41 \mu\text{g mL}^{-1}$  (27.4  $\mu\text{M}$ ) after 24 h.

## SUBSTÂNCIAS ISOLADAS



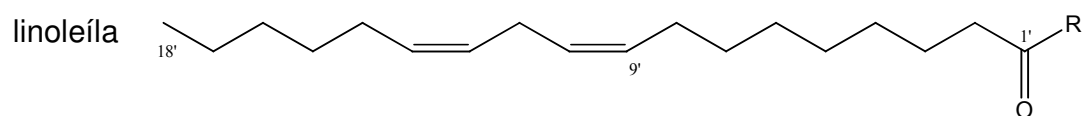
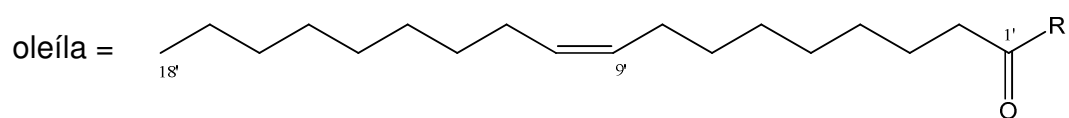






**20** – R = oleíla  
**21** – R = linoleíla

**22** – R = oleíla  
**23** – R = linoleíla



## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos tempos os seres humanos têm contado com a natureza para atender suas necessidades básicas. Plantas em particular, tem sido uma fonte de recursos terapêuticos por milênios, com os primeiros registros datando cerca de 2600 a. C., citando aproximadamente mil substâncias derivadas de plantas que seriam usadas na Mesopotâmia (CRAGG e NEWMAN, 2013). A busca por alívio e cura de doenças, pela ingestão de ervas e folhas, talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza, pelos povos primitivos e pelos indígenas pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias biologicamente ativas ao longo do tempo. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais (VIEGAS *et al.*, 2006).

Os metabólitos secundários são substâncias relacionadas ao desenvolvimento, regulação, equilíbrio e defesa dos organismos que os contêm. São também de grande utilidade para o homem como fármacos, alimentos, fragrâncias, cosméticos e agroquímicos (FUNARI *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas tem havido um renovado interesse pelas plantas medicinais. A comprovação científica, e o desenvolvimento de produtos fitoterápicos, bem como o seu baixo custo em relação aos medicamentos industriais têm levado a introdução do uso de plantas medicinais nos sistemas públicos de saúde. Paralelamente, a comunidade científica tem intensificado a busca no reino vegetal de novas substâncias que possam ser úteis para o tratamento de doenças ainda não controladas ou oportunistas. A cada ano aumenta o número de trabalhos publicados relacionados com a atividade biológica de substâncias oriundas de plantas. A biodiversidade continua sendo uma fonte inigualável de substâncias com grande diversidade química, funcional e estrutural, portanto, de grande utilidade para a descoberta de novos fármacos e outros bioprodutos (CRAGG e NEWMAN, 2013; FUNARI *et al.*, 2013).

Produtos naturais descritos até hoje foram isolados ou registrados a partir de menos de 10% da biodiversidade do mundo, sendo que, para os relatos de atividades biológicas essa parcela é ainda menor. A maior parte da biodiversidade mundial está presente em países da América Latina. O Brasil possui aproximadamente 20% de todas as plantas e micro-organismos existentes no planeta. Apesar da intensificação dos estudos com produtos naturais nos últimos anos, ainda é imenso o número de espécies sem qualquer estudo e

que, potencialmente podem contribuir para a descoberta de novas substâncias úteis (FUNARI *et al.*, 2013; CALIXTO, 2005).

É necessário ainda considerar que é pouco provável que famílias ou gêneros muito estudados possam fornecer substâncias realmente novas ou com atividade farmacológica diferenciada.

Por estas razões a pesquisa de substâncias úteis precisa direcionar-se para aquelas famílias pouco estudadas, mas quimicamente promissoras.

### 1.1. Família Gesneriaceae

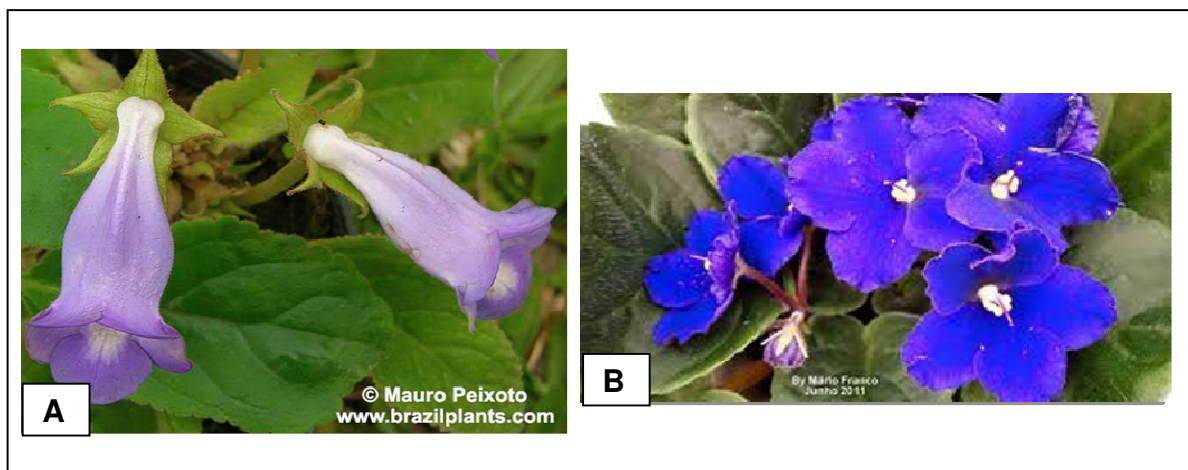
A família Gesneriaceae Rich. & Juss. Ex DC., pertencente à ordem Lamiales, compreende cerca de 150 gêneros e 3000 espécies. É uma família com ampla distribuição em todo o mundo, sendo suas espécies bem representadas nos trópicos e subtropicais, com poucas espécies nativas em regiões temperadas. No Brasil a família é estimada em 28 gêneros e 215 espécies. As espécies de Gesneriaceae são encontradas principalmente em matas úmidas da região amazônica ou na Mata Atlântica, sendo algumas vezes nativas de campos rupestres de planalto. O Rio Grande do Norte é o único estado onde ainda não foi registrada a ocorrência de Gesneriaceae (ARAUJO e CHAUTEMS, 2014; CHAUTEMS *et al.*, 2010; GASPARINO, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2005).

As espécies de Gesneriaceae são ervas, cipós, arbustos ou raramente pequenas árvores, e podem ser terrestres, epífitas (crescendo sobre árvores) ou rupícolas (crescendo sobre rochas). Apresentam sistema subterrâneo tuberoso, raízes fibrosas e caule herbáceo ou lenhoso. Suas folhas geralmente possuem pelos e suas flores são encontradas em grande variedade de cores e formatos (BOGGAN e SHALIT, 2006).

Muitas espécies de Gesneriaceae são ornamentais tais como a belíssima gloxínia do gênero *Sinningia* e a conhecida violeta africana do gênero *Saintpaulia* (Figura 01 – página 03). Espécies dessa família têm uso na medicina popular para o tratamento de febre, problemas respiratórios (tosse, resfriado, gripe), inflamações, feridas, dores e doenças infecciosas (VERDAN e STEFANELLO, 2012; GASPARINO, 2008).

Há poucos estudos sobre a composição química das espécies de Gesneriaceae. As primeiras investigações visavam a identificação de substâncias que pudessem servir como marcadores químicos, auxiliando na classificação botânica, mas nos últimos anos tem havido um interesse crescente no isolamento dos constituintes químicos desta família. Estudos conduzidos até o momento mostram que as espécies de Gesneriaceae produzem uma

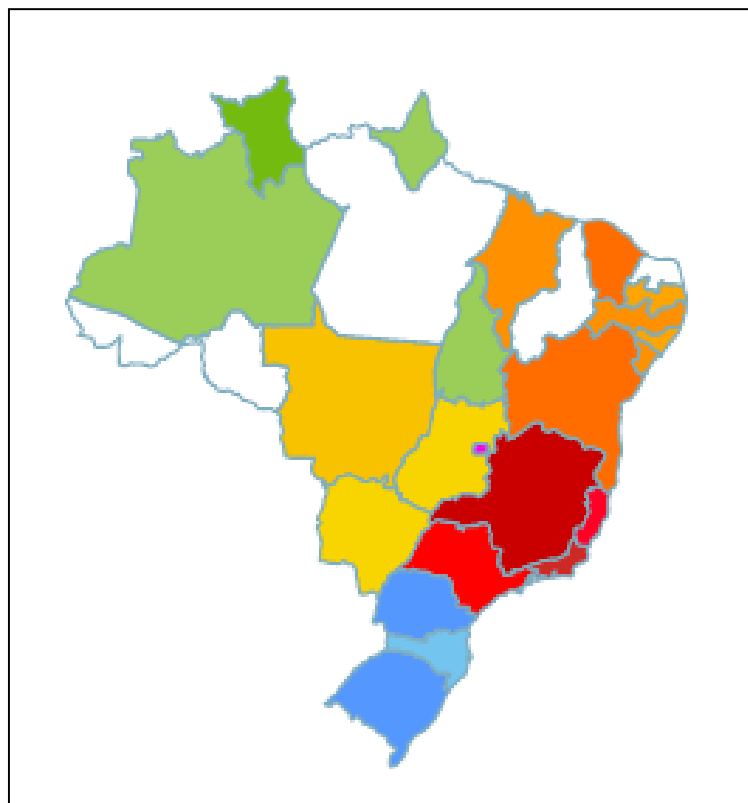
grande diversidade de metabólitos secundários, incluindo flavonoides, terpenos, esteroides, glicosídeos fenólicos, lignanas, quinonas e xantonas (VERDAN e STEFANELLO, 2012).



**Figura 01** – Espécies de Gesneriaceae. **A:** *Sinningia speciosa* (Gloxínia). **B:** *Saintpaulia ionantha* (Violeta africana) (www.brazilplants.com)

## 1.2. Gênero *Sinningia*

O gênero *Sinningia* compreende atualmente 68 espécies, das quais 67 são encontradas no Brasil e distribuídas por todas as regiões do país (Figura 02 – página 04). O maior centro de diversidade do gênero encontra-se na região sudeste, onde é encontrada a maioria das espécies, seguido da região sul. As espécies de *Sinningia* são ervas ou subarbustos, a maioria de ciclo anual, com tubérculo perene. Crescem durante a primavera, florescem e entram em declínio durante o outono/inverno, quando perdem as suas partes aéreas. As gemas dormentes permanecem nos tubérculos, ocorrendo o brotamento quando as condições se tornam favoráveis (primavera/verão). Todas as espécies de *Sinningia* produzem belas flores, tendo um grande potencial ornamental. Uma das mais cultivadas é *S. speciosa*, comercializada com o nome de “gloxinia”. As características fenológicas deste gênero aliada a uma coleta indiscriminada tem colocado algumas espécies em risco de extinção (ARAUJO e CHAUTEMS, 2014; CHAUTEMS *et al.*, 2010; UNEMOTO *et al.*, 2006; ARAUJO *et al.*, 2005).



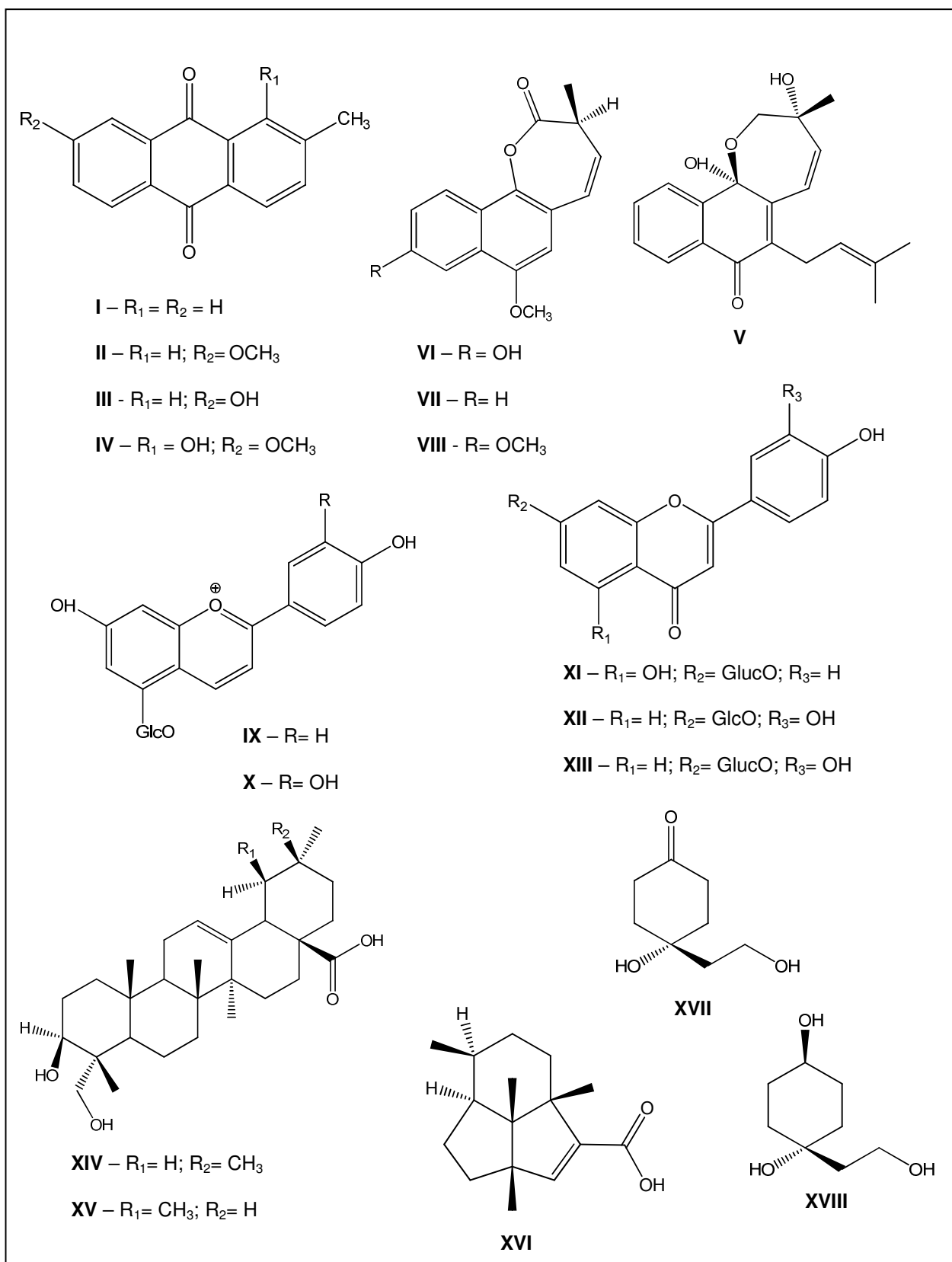
**Figura 02** – Distribuição geográfica de espécies do gênero *Sinningia* no Brasil. A cor branca indica ausência de registro naquele estado (ARAUJO e CHAUTEMS, 2014)

Poucas espécies do gênero *Sinningia* tiveram algum estudo fitoquímico. Antocianinas foram isoladas das flores de *Sinningia cardinalis* (SWINNY *et al.*, 2000). Antraquinonas e etilcicloexanos foram relatados em *Sinningia speciosa* (VERDAN *et al.*, 2009), enquanto que de *Sinningia aggregata* foram isoladas três antraquinonas conhecidas e quatro substâncias aromáticas, com um novo esqueleto carbônico, denominadas aggregatinas (VERDAN *et al.*, 2010). Recentemente, triterpenos e um novo sesquiterpeno foram encontrados em *Sinningia leucotricha* (VERDAN *et al.*, 2013) (Figura 03 – página 06; Tabela 01 – página 05).

No estado do Paraná são encontradas 17 espécies de *Sinningia* (ARAUJO e CHAUTEMS, 2014), entre as quais se destaca *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler, única espécie encontrada com indicação na medicina popular. Esta espécie não possui relatos anteriores de estudos fitoquímicos ou farmacológicos.

**Tabela 01** – Substâncias isoladas de *Sinningia* spp

Substâncias	Espécie
<b>I</b> – tectoquinona	<i>S. aggregata</i>
<b>II</b> – 2-metil-7-metoxiantraquinona	<i>S. aggregata</i> , <i>S. speciosa</i>
<b>III</b> – 2-metil-7-hidroxiantraquinona	<i>S. aggregata</i>
<b>IV</b> – rubiawallina B	<i>S. speciosa</i>
<b>V</b> – aggregatina D	<i>S. aggregata</i>
<b>VI</b> – aggregatina A	<i>S. aggregata</i>
<b>VII</b> – aggregatina B	<i>S. aggregata</i>
<b>VIII</b> – aggregatina C	<i>S. aggregata</i>
<b>IX</b> – 5- $\beta$ -glicosil-apigenidina	<i>S. cardinalis</i>
<b>X</b> – 5- $\beta$ -glicosil-luteolinidina	<i>S. cardinalis</i>
<b>XI</b> – scutelarina A	<i>S. cardinalis</i>
<b>XII</b> – 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo-luteolina	<i>S. cardinalis</i>
<b>XIII</b> – 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo- luteolina	<i>S. cardinalis</i>
<b>XIV</b> – hederagenina	<i>S. leucotricha</i>
<b>XV</b> – ácido 23-hidroxiursólico	<i>S. leucotricha</i>
<b>XVI</b> – ácido leucotrichóico	<i>S. leucotricha</i>
<b>XVII</b> – cleroindicina B	<i>S. speciosa</i>
<b>XVIII</b> – isorengiol	<i>S. speciosa</i>



**Figura 03** – Estruturas das substâncias isoladas de *Sinningia* spp

### 1.3. *Sinningia allagophylla*

*Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Figura 04 – página 07) é uma espécie arbustiva, que atinge até 1 m de altura, sendo encontrada no Brasil desde Goiás até o Rio Grande do Sul, além do Paraguai e Argentina. Distingue-se pela intensa coloração (rosa, vermelho ou alaranjado) das inflorescências e das hastes que as suportam, podendo esta coloração chegar até as partes vegetativas. Possui caule ereto, simples, piloso, nascendo em vários ramos de um órgão subterrâneo; as folhas são resistentes, com inervação proeminente, e as flores são reunidas em cachos terminais com a corola cilíndrica. Recebe os nomes populares de cravo-da-campo, batatinha-do-campo ou batata-de-perdiz. Os tubérculos são empregados como tônico e emoliente, enquanto que as flores e folhas são utilizadas como antitérmico, depurativo e diurético (ARAUJO *et al.*, 2005; CHAUTEMS, 2003; GOMES e SHEPHERD, 2000; MORS *et al.*, 2000).



**Figura 04** – Fotos de *Sinningia allagophylla* mostrando o seu ciclo de crescimento



#### 1.4. Atividade citotóxica

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a se manter vivas, podendo levar a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2014).

Ao longo das últimas décadas, o câncer tornou-se uma preocupação cada vez maior para os sistemas de saúde, devido ao alto índice de mortalidade registrado em todo o mundo. Estima-se um aumento de casos em quase 80% até 2030. Embora esta doença possa surgir em qualquer idade, geralmente torna-se mais invasiva a partir dos 65 anos (KHAZIR *et al.*, 2014; OCHWANG'I *et al.*, 2014).

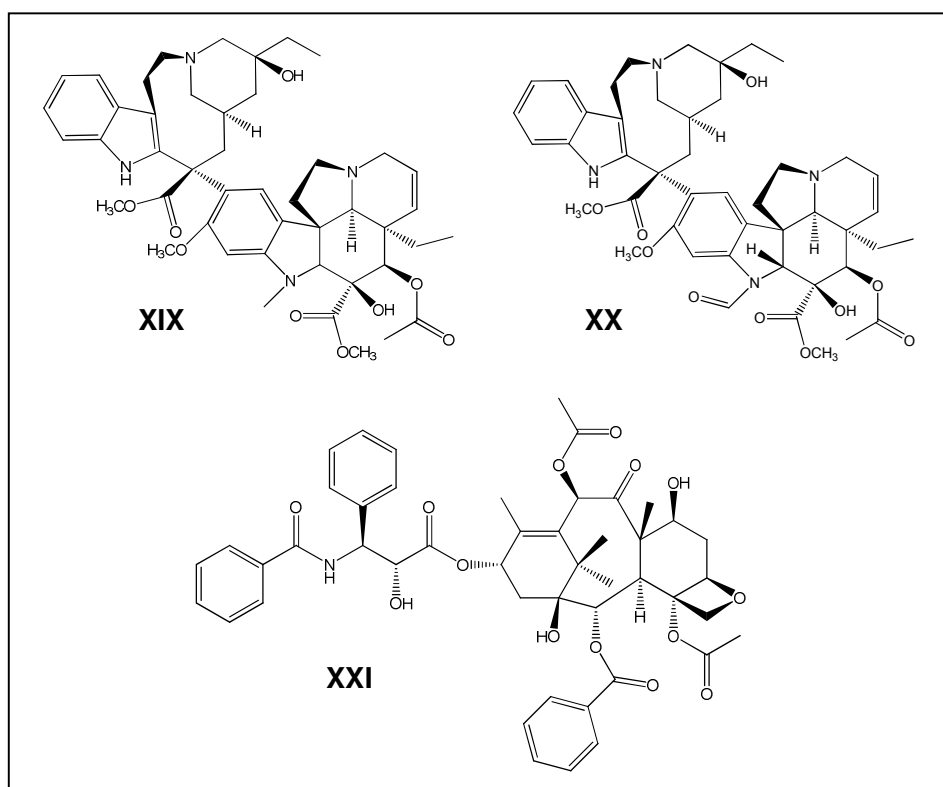
As causas da crescente incidência de câncer não são bem conhecidas, no entanto, o aumento do risco de câncer pode estar relacionado a fatores externos como: o uso do tabaco, certas infecções, radiação, falta de atividade física, idade, má alimentação, obesidade, produtos químicos e poluentes ambientais. E também a fatores internos: mutações hereditárias, hormônios, condições imunológicas e mutações que ocorrem a partir do metabolismo. Estes fatores podem danificar genes diretamente ou em conjunto para promover o desenvolvimento da doença (KHAZIR *et al.*, 2014; OCHWANG'I *et al.*, 2014).

A terapia do câncer tem sido notavelmente consistente nos últimos 50 anos. Cirurgia, radioterapia e quimioterapia têm sido os pilares no tratamento convencional. A sobrevivência dos pacientes varia muito, dependendo do tipo, localização e estágio da doença no início do tratamento. A eficácia da quimioterapia, por exemplo, está frequentemente limitada por vários efeitos tóxicos secundários, devido a sua falta de seletividade para as células neoplásicas. Hoje, a luta contra o câncer tem grande importância e inúmeras abordagens científicas multidisciplinares têm sido aplicadas na tentativa de descobrir novos recursos terapêuticos para esta doença. Existe a necessidade de desenvolver novos agentes quimioterápicos, mais seletivos, eficazes e seguros, que possam agir nas células tumorais sem afetar as células normais (KHAZIR *et al.*, 2014; OCHWANG'I *et al.*, 2014; DHAMIJA *et al.*, 2013).

As plantas têm sido uma fonte de substâncias bioativas há milhares de anos e continuam a desempenhar um papel essencial na descoberta de novos fármacos. Muitos agentes antineoplásicos disponíveis atualmente no uso clínico são de origem vegetal, tais como os alcaloides vimblastina (XIX) e vincristina (XX) (Figura 05 – página 09), encontradas em *Vinca rosea*, e o terpenoide paclitaxel (XXI) (Figura 05 – página 09) derivado do taxol

encontrado em *Taxus brevifolia* (KHAZIR *et al.*, 2014; OCHWANG'I *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2014; DHAMIJA *et al.*, 2013; DUFFY, *et al.*, 2012).

Existe um potencial extraordinário para a descoberta de novos fármacos anticâncer de ocorrência natural em função da existência de um grande número de espécies disponíveis para investigação. Calcula-se que menos de 2% das plantas superiores foram analisadas para detecção de constituintes com atividade antineoplásica e mesmo assim, buscando apenas a atividade citotóxica (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).



**Figura 05** – Estruturas das substâncias vimblastina (XIX), vincristina (XX) e paclitaxel (XXI)

### 1.5. Atividade analgésica e anti-inflamatória

A palavra inflamação, do grego *phlogosis* e do latim *flamma*, significa fogo, área em chamas. Esse importante sintoma foi descrito pela primeira vez por Celsus, um escritor romano que viveu entre os anos 30 aC e 38 dC, que observou os quatro sinais cardinais da inflamação: calor (aumento da temperatura local), rubor (hiperemia), tumor (edema) e dor, as quais posteriormente foi acrescentado um quinto sinal clínico, a perda da função (*functio laesa*) (FAVACHO, 2009).

A inflamação é um fenômeno complexo de alterações que ocorre nos tecidos em resposta a um estímulo lesivo, como por exemplo: a radiação ultravioleta, estímulos químicos, as infecções e o choque mecânico (DALMARCO, 2012). É uma tentativa de proteção do organismo para remover estímulos nocivos e para iniciar o processo de cura (RAMKUMAR *et al.*, 2012). A resposta inflamatória é um processo mediado através de uma variedade de moléculas sinalizadoras liberadas por terminações nervosas, mastócitos, plaquetas e leucócitos. Algumas dessas moléculas e os seus precursores (prostaglandina, óxido nítrico, adenosina deaminase e mieloperoxidase) são utilizados como marcadores de inflamação. A inflamação é uma das manifestações mais comuns em muitas doenças e, afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Supondo que não existisse o processo inflamatório, teríamos consequências graves: haveria um descontrole das infecções, não haveria cicatrização das feridas além de que o processo destrutivo nos órgãos atacados seria permanente. A inflamação é a resposta inicial ao agressor e torna-se desconfortável para o paciente devido ao edema formado e a dor (RAMKUMAR *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2013).

A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório e decorre da sensibilização dos nociceptores. A dor pode ser definida como uma percepção desagradável de uma sensação nociceptiva. Esse conceito envolve dois componentes: a nocicepção e a percepção. A percepção da dor é a integração funcional dos sinais da via da dor, modulado por condições psicológicas, motivacionais e emocionais, além da história individual. A nocicepção ou a sensação nociceptiva resulta da ativação de subpopulações de neurônios sensoriais primários específicos que transmitem a informação nociceptiva para o cordão espinhal, sendo retransmitido até o córtex (NAVARRO *et al.*, 2013; PIRES, 2009; VERRI *et al.*, 2006).

Atualmente, vários agentes anti-inflamatórios e analgésicos potentes são usados para o tratamento de diferentes tipos de dor associada com inflamação. Estes agentes são eficazes na maior parte dos casos, mas os efeitos colaterais são comuns, especialmente quando são usados por longos períodos de tempo. O efeito colateral mais comum é a perturbação gastrointestinal (COSTA *et al.*, 2013).

Apesar dos progressos alcançados na pesquisa nas últimas décadas, o tratamento de muitas doenças ainda é problemático. A inflamação se tornou um foco mundial de pesquisa científica devido à sua implicação em praticamente todas as doenças humanas e animais (RAMKUMAR *et al.*, 2012).

## 1.6. Atividade larvívica

Mosquitos atuam como vetores de diversas doenças, causando sérios problemas à saúde do homem e em alguns casos levando ao desenvolvimento de epidemias de difícil controle. O uso contínuo e indiscriminado de inseticidas químicos no combate a mosquitos causadores em potencial de certas doenças infecciosas tem provocado danos à saúde do homem e ao meio ambiente, além de promover a seleção de resistência nestes aos inseticidas comerciais (SANTIAGO *et al.*, 2005).

A dengue, doença infecciosa de natureza viral, transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*, é considerada uma doença re-emergente. Originário da África e, dotado de grande capacidade de adaptação, o *Aedes aegypti* dispersou-se pelo planeta a partir do século XVII. Desde este período, casos de dengue foram documentados em todos os continentes, com exceção da Antártida. No Brasil há relatos de surtos de dengue desde meados do século XIX, porém, a primeira epidemia registrada ocorreu na década de 1980, na cidade de Boa Vista – RO (GARCEZ *et al.*, 2013).

O complexo dengue tem como agente etimológico um arbovírus que apresenta quatro diferentes sorotipos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4), gerando uma sucessão de manifestações clínicas, que incluem a dengue clássica e a febre hemorrágica da dengue (PUGACHEV *et al.*, 2003).

Na região das Américas foram registrados, no início de 2012, mais de 120.000 casos de dengue pelo Programa Regional da dengue da OPAS/OMS, com 1855 casos graves e 40 óbitos, tendo sido verificada a manifestação dos quatro sorotipos de vírus. Nesse contexto, a dengue tornou-se um problema contemporâneo e urgente para o sistema sanitário (GARCEZ *et al.*, 2013).

A estratégia mais amplamente adotada para diminuir a incidência dessa doença consiste em controlar a população de larvas do mosquito. A ocorrência cada vez maior de populações resistentes de mosquitos, devido ao uso contínuo de inseticidas sintéticos, além da poluição ambiental e da toxicidade dos pesticidas comerciais a organismos não-alvo, tem estimulado a procura por métodos alternativos para o controle do mosquito. Neste sentido, substâncias de origem vegetal surgem como uma estratégia promissora, eficiente e ambientalmente segura para reduzir a população de larvas de mosquitos *Aedes aegypti*. Dentre os inseticidas orgânicos, cujas substâncias ativas são provenientes de plantas destacam-se: o alcaloide nicotina, isolado de espécies de *Nicotiana*; os piretroides piretrina e aletrina, extraídos das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, o rotenoide rotenona, isolado de espécies dos gêneros *Derris* e *Lonchocarpus*, e mais recentemente, o limonoide

azadiractina, obtido de *Azadirachta indica* (GARCEZ *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2005; SOLOWAY, 1976).

O estudo de produtos naturais obtidos de plantas com atividade larvícida contra *Aedes aegypti* é recente, sendo encontrados trabalhos realizados com o intuito de isolar e caracterizar tais substâncias bioativas a partir da década de 1980. A maior parte dos estudos foi realizada com extratos brutos e óleos essenciais, sendo que, na maioria destes casos, não se conhece a substância responsável pela atividade apresentada (GARCEZ *et al.*, 2013).

As plantas representam um imenso potencial como fonte de substâncias com atividade larvícida para este agente. O Brasil, com a enorme diversidade de sua flora brasileira pode contribuir para a descoberta de agentes eficientes para o controle deste vetor com baixa toxicidade ao homem e a outros organismos vivos (GARCEZ *et al.*, 2013).

## 2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

*Objetivos gerais:* Realizar o estudo fitoquímico de *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae) e avaliar a sua atividade biológica.

*Objetivos específicos:* isolar e identificar os metabólitos secundários dos tubérculos de *S. allagophylla*. Realizar testes de atividade larvícida, anti-inflamatória, analgésica e antiproliferativa com os extratos e substâncias obtidas.

## 3. ESTUDO FITOQUÍMICO

### 3.1. Materiais e Métodos

#### 3.1.1. Procedimentos gerais

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D foram obtidos em espectrômetros modelos DPX-200, Avance-400 e/ou Avance III 600 (Bruker), operando respectivamente a 200, 400 e 600 MHz para hidrogênio e, 50, 100 e 150 MHz para carbono. Os experimentos foram conduzidos em solvente deuterado (CDCl<sub>3</sub> e/ou CD<sub>3</sub>OD), usando-se TMS como referência interna.

Análises por CG-EM foram realizadas em um Cromatógrafo à Gás acoplado a Espectrômetro de Massas Shimadzu (CGEM-QP2010 Plus) do Laboratório de Cromatografia da Universidade Regional de Blumenau. O cromatógrafo estava equipado com uma coluna capilar RTx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m), que foi operada nas seguintes condições: 60 °C por 5 min, em seguida programada até 240 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> e, finalmente, mantida a 240 °C por 5 min. O gás de arraste foi He, usado em um fluxo constante de 1 mL min<sup>-1</sup>. As amostras foram dissolvidas em éter etílico e o volume injetado foi de 1  $\mu$ L. O índice de retenção das substâncias (IR) foi calculado em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>19</sub>) analisada nas mesmas condições. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro QqTof (Micromass) ou LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific) utilizando a técnica de ionização por *spray* de elétrons (ESI). As amostras, dissolvidas em metanol com 0,1% de ácido fórmico, foram injetadas diretamente no espectrômetro, obtendo-se os espectros no modo positivo. Estas análises foram conduzidas na Unicamp (Prof. Dr. Marcos Eberlin) ou no Departamento de Bioquímica da UFPR (Dr. Lauro M. Souza). Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos em CHCl<sub>3</sub>, em um espectrômetro Jasco J-815 CD.

A rotação específica das substâncias isoladas foi determinada em metanol, usando um polarímetro JASCO P-2000 POLARIMETER com lâmpada da raia “D” de sódio (589 nm). Os valores de rotação específica foram calculados utilizando a fórmula a seguir:

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\text{rotação observada em graus} \times 100}{\text{Comprimento da cubeta (cm)} \times \text{concentração (g/100 mL)}}$$

Nas separações cromatográficas em coluna aberta (CC) e sob vácuo (CLV) foi utilizado gel de sílica (Merck, 7734). Placas comerciais (Macherey-Nagel) foram utilizadas nas análises por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), enquanto que as placas para separações por camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas no laboratório, com uma espessura de 1,0 mm, utilizando-se gel de sílica 60PF<sub>254</sub> (Merck). As placas foram reveladas com luz UV (254 e 366 nm) e solução etanólica de ácido sulfúrico (5% v/v), seguida de aquecimento. As frações obtidas da CC foram agrupadas por similaridade, em termos de fator de retenção e comportamento químico frente ao revelador, após análise por CCDA. O critério de pureza adotado foi o aparecimento de uma única mancha quando a amostra era analisada em, pelo menos, três diferentes eluentes.

Purificações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas em um equipamento HPLC Waters, composto por bomba quaternária, injetor automático, detector PDA 2998 e acoplado a um sistema de aquisição de dados Empower software. A coluna utilizada foi Macherey-Nagel com fase estacionária: Nucleosil 100-5 C18, tamanho de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , comprimento de 250 mm e diâmetro interno de 4,6 mm. A fase móvel foi 100% acetonitrila, com fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, durante 8 min.

### 3.1.2. Material vegetal

*Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler foi coletada no município de Palmeira, PR, em março/2008. A planta foi identificada pela botânica Clarisse Bolfe Poliquesi (Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Curitiba), que depositou uma exsicata no herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM 313530).

### 3.1.3. Preparação dos extratos e frações

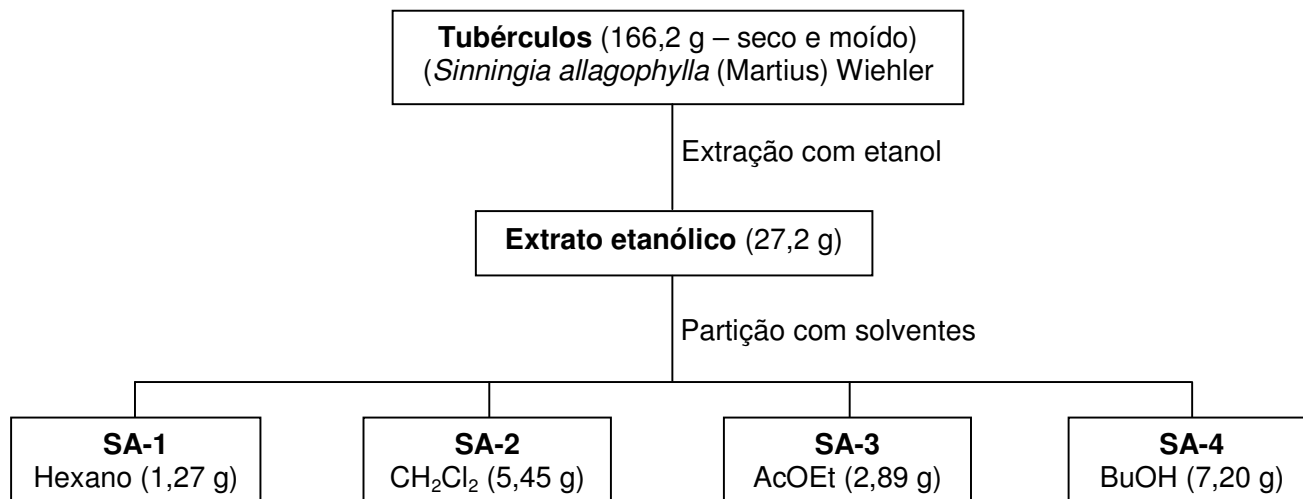
O material botânico foi secado em estufa a 40 °C e posteriormente moído, obtendo-se 166,2 g. Os extratos foram obtidos pela técnica de maceração a frio, onde o solvente (500 mL para cada 100 g de material) foi deixado em contato com o material por 24 h, e então renovado. Foram realizadas três extrações sucessivas. As soluções obtidas foram reunidas e o solvente foi removido em evaporador rotativo, rendendo 28,2 g de extrato (16,96%). Parte do extrato em etanol (27,2 g) foi dissolvido em etanol: água 1:1 (300 mL) e submetido a partição com hexano (**SA-1**), diclorometano (**SA-2**), acetato de etila (**SA-3**) e 1-butanol (**SA-4**) (3 x 100 mL, de cada solvente). Desta forma foram obtidas quatro frações (Esquema 01 – página 15).

#### 3.1.3.1. Isolamento dos constituintes da fração hexânica (SA-1)

A fração em hexano do extrato etanólico (1,27 g) foi submetida à CC rápida, eluída com hexano:acetona 95:5, hexano:acetona 8:2, hexano:acetona 1:1, acetona pura e metanol, rendendo cinco subfrações: (**SA1-1**, 849,0 mg), (**SA1-2**, 147,0 mg), (**SA1-3**, 83,9 mg), (**SA1-4**, 31,0 mg) e (**SA1-5**, 168,0 mg).

A subfração **SA1-1** (849,0 mg) foi submetida à CC, eluída primeiramente com hexano:AcOEt 98:2, aumentando gradativamente a polaridade até 8:2 e por último metanol.

Foram recolhidas 61 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram agrupadas em 19 frações, após comparação por CCDA (Tabela 02 – página 15).



**Esquema 01** – Extração e fracionamento dos tubérculos de *Sinningia allagophylla*

**Tabela 02** – Agrupamento das frações da coluna de **SA1-1**

Fração	Código	Solvente (v/v)	Massa (mg)
1	SA1-11	Hex:AcOEt 98:2	50,9
2-5	SA1-12	Hex:AcOEt 98:2	1,2
6 – 9	SA1-17	Hex:AcOEt 98:2	315,2
10-12	SA1-18	Hex:AcOEt 98:2	7,3
13 – 17	SA1-110	Hex:AcOEt 98:2	26,5
18 – 21	SA1-111	Hex:AcOEt 95:5	18,1
22 – 26	SA1-112	Hex:AcOEt 95:5	82,6
27 – 30	SA1-113	Hex:AcOEt 90:10	33,1
31 – 37	SA1-114	Hex:AcOEt 90:10	37,3
38 – 39	SA1-115	Hex:AcOEt 90:10	7,6
40 – 43	SA1-116	Hex:AcOEt 80:20	106,8
44 – 48	SA1-117	Hex:AcOEt 80:20	65,0
49 – 50	SA1-118	Hex:AcOEt 80:20	7,9
51 – 58	SA1-119	Hex:AcOEt 80:20	10,4
59-61	SA1-120	MeOH	87,8



A fração **SA1-17** (315,2 mg) foi submetida à CC e eluída com hexano, hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 99:1 e hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 98:2. Foram recolhidas 130 subfrações que foram agrupadas, segundo realização de CCDA, em 8, conforme demonstrado na Tabela 03 – página 16.

**Tabela 03** – Agrupamento das subfrações da coluna de **SA1-17**

Fração	Código	Solvente (v/v)	Massa (mg)
1 – 36	SA1-1733	Hexano	2,5
37– 75	SA1-1737	Hexano	21,1
76 – 97	SA1-1785	Hexano	19,1
98	SA1-1798	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 99:1	53,1
99	SA1-1799	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 99:1	3,1
100 – 128	SA1-17100	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 99:1	186,8
129	SA1-17129	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 98:2	5,2
130	SA1-17130	Hex:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 98:2	12,1

As frações **SA1-1733** e **SA1-17129** foram obtidas como as substâncias puras **1** (2,5 mg) e **2** (5,2 mg), respectivamente.

A subfração **SA1-1737** (21,1 mg) foi submetida à CCDP, eluída com hexano:acetona 98:2, resultando no isolamento de **2** (9,0 mg) e **5** (1,0 mg).

A subfração **SA1-1785** (19,1 mg) foi submetida à CCDP, eluída com hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2:1, resultando no isolamento da mistura de **20**, **21**, **22** e **23** (7,8 mg).

A subfração **SA1-1798** (53,1 mg) foi submetida à CCDP, eluída com hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2:1, rendendo **2** (3,6 mg) e a mistura de **20**, **21**, **22** e **23** (37,7 mg).

A subfração **SA1-17100** (186,8 mg) foi submetida à CC, eluída com hexano:acetona 5:1, aumentando gradativamente a polaridade até 3:1, depois acetona pura e por último metanol. Este procedimento resultou em 30 subfrações. A subfração **SA1-171002** (99,1 mg) foi submetida à CCDP, rendendo **2** (60,0 mg), e a mistura de **20**, **21**, **22** e **23** (17,9 mg).

A fração **SA1-110** (26,5 mg) foi submetida à CCDP e eluída com hexano:acetato de etila 95:5, resultando em 3 subfrações: **SA1-110A** (13,7 mg), **SA1-110B** (10,2 mg) e **SA1-110C** (0,7 mg). A subfração **SA1-110A** (13,7 mg) foi submetida novamente à CCDP e eluída com hexano:acetona 2:1, rendendo **9** (5,3 mg). A subfração **SA1-110B** (10,2 mg) também foi submetida novamente à CCDP e eluída com hexano:acetona 2:1, fornecendo **8** (3,4 mg) e **16** (2,0 mg).

As frações **SA1-111** (18,1 mg) e **SA1-112** (82,6 mg) continham as mesmas substâncias já isoladas nas frações anteriores.

A fração **SA1-113** (33,1 mg) foi submetida à CCDP, eluída com hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:metanol 4:1:0,1, resultando em 5 subfrações: **SA1-113A** (4,2 mg), **SA1-113B** (2,0 mg), **SA1-113C** (1,0 mg), **SA1-113D** (7,7 mg) e **SA1-113E** (0,6 mg), resultando no isolamento de **10** (4,2 mg) e da mistura de **17**, **18** e **19** (7,7 mg). A Subfração **SA1-113B** (2,0 mg) foi purificada por CLAE rendendo **6** (1,8 mg), sendo o pico coletado em um tempo de retenção de 5,30 min.

A fração **SA1-3** (83,9 mg) foi submetida à CCDP eluída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:metanol 9:1, resultando em 3 subfrações: **SA1-3A** (11,0 mg), **SA1-3B** (5,8 mg) e **SA1-3C** (39,9 mg). Esta última foi submetida à nova CCDP, eluída com hexano:acetona 1:1, ocorrendo o isolamento de **16** (12,2 mg).

O Esquema 02 – página 21 representa o fracionamento de **SA-1**.

### 3.1.3.2. Isolamento dos constituintes da fração em diclorometano (SA-2)

**SA-2** foi submetida à CC, eluída inicialmente com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e na sequência com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:acetona 95:5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:acetona 8:2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:acetona 1:1, acetona pura e por último com metanol. Foram recolhidas 115 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram agrupadas em 14 frações, após comparação por CCDA (Tabela 04 – página 17).

**Tabela 04 – Agrupamento das frações da coluna de SA-2**

Fração	Código	Solvente (v/v)	Massa (mg)
1	SA2-1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10,5
2 – 19	SA2-2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	104,6
20 – 28	SA2-20	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	24,7
29 – 33	SA2-29	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	16,9
34 – 36	SA2-34	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	17,0
37 – 41	SA2-37	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	34,4
42 – 45	SA2-42	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20,4
46 – 54	SA2-46	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	59,7
55 – 96	SA2-55	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona 95:5	89,7
97 - 99	SA2-97	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona 8:2	81,5
100 – 107	SA2-100	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona 1:1	200,0
108 – 109	SA2-108	Acetona	1170,0
110 – 115	SA2-110	MeOH	2470,0

A fração **SA2-1** (10,5 mg) foi identificada como **2**.

A fração **SA2-2** (104,6 mg) foi submetida à CC, eluída primeiramente com hexano, aumentando gradativamente a polaridade até 1:1 e por último acetona pura. Foram recolhidas 90 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram agrupadas em 8 frações, após comparação por CCDA (Tabela 05 – página 18).

A subfração **SA2-213** (22,6 mg) foi submetida à CCDP, eluída com hexano:acetona 95:5, resultando em 3 subfrações: **SA2-213A** (1,2 mg, **1**), **SA2-213B** (8,5 mg, **2**) e **SA2-213C** (1,9 mg, **9**).

A subfração **SA2-219** (24,1 mg) foi submetida à CCDP, eluída com hexano:acetona 95:5, resultando no isolamento de 4 substâncias: **1** (1,0 mg), **2** (7,6 mg), **9** (3,5 mg) e **8** (1,0 mg).

A subfração **SA2-227** (30,1 mg) foi analisada por CCDA, eluída com hexano:acetona 8:2 e comparada com substâncias já isoladas anteriormente. Nesta fração estão presentes as substâncias **1**, **2**, **8** e **9**.

**Tabela 05 – Agrupamento das frações da coluna de SA2-2**

Fração	Código	Solvente (v/v)	Massa (mg)
1 – 12	SA2-210	Hex:Acetona 99:1	7,9
13 – 18	SA2-213	Hex:Acetona 99:1	22,6
19 – 26	SA2-219	Hex:Acetona 98:2	24,1
27 – 46	SA2-227	Hex:Acetona 98:2	30,1
47 – 51	SA2-247	Hex:Acetona 97:3	6,1
52 – 64	SA2-252	Hex:Acetona 9:1	12,3
65 – 77	SA2-265	Hex:Acetona 1:1	6,0
78 – 90	SA2-277	Acetona	2,0

A fração **SA2-29** (16,9 mg) foi submetida à CCDP, eluída com hexano:acetona 8:2, resultando em 8 subfrações, sendo que a subfração **SA2-29D** (8,2 mg) foi ressubmetida à CCDP, eluída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:hexano 9:1, seguida de purificação por CLAE, resultando no isolamento de **7** (1,0 mg), sendo o pico coletado em um tempo de retenção de 5,00 min.

A fração **SA2-46** (59,7 mg) foi submetida à CCDP, eluída com benzeno:acetato de etila 95:5, resultando em 6 subfrações. A subfração **SA2-46B** (34,5 mg) foi submetida à CCDP e eluída com benzeno:acetato de etila 95:5, rendendo 5 subfrações. A subfração **SA2-46BC** (1,1 mg) foi identificada como **3**. A subfração **SA2-46BD** (18,0 mg) foi submetida à CCDP eluída com tolueno:AcOEt 95:5 rendendo **11** (2,8 mg) e a fração **SA2-46BDB** (4,0

mg) foi submetida a CCDP eluída com tolueno:éter etílico 8:2 (4x), rendendo **15** (0,4 mg) e **4** (1,3 mg). A subfração **SA2-46C** (8,5 mg) foi submetida à CCDP, eluída com tolueno:acetato de etila 95:5, resultando em 3 subfrações. A subfração **SA2-46CC** (7,4 mg) foi submetida novamente à CCDP, eluída no mesmo sistema de solvente, rendendo **12** (3,8 mg) e **14** (1,7 mg).

A fração **SA2-55** (49,7 mg) foi submetida à CCDP, eluída com hexano:acetona 9:1, resultando em 7 subfrações. A subfração **SA2-55A** (32,3 mg) foi novamente submetida à repetidas CCDP, eluída com hexano:acetona 8:2, fornecendo **11** (4,0 mg). A subfração **SA2-55C** (12,7 mg) foi submetida à outra CCDP, eluída com hexano:acetona 8:2, rendendo **11** (5,8 mg) e **15** (3,0 mg). A subfração **SA2-55M** (6,4 mg) foi submetida à CCDP, eluída com hexano:acetato de etila 95:5, rendendo **13** (0,8 mg).

A fração **SA2-108** (1,17 g) foi submetida a CC (Sephadex LH-20) e eluída com metanol. Foram recolhidas 5 frações de 50 mL. A fração **SA2-108-2** (1,06 g) foi submetida a CC, eluída primeiramente com benzeno:metanol 99:1, aumentando a polaridade até 1:1, e por último metanol. Foram recolhidas 18 frações de 10 mL. A fração **SA2-10824** (753,7 mg) foi submetida novamente a CC, eluída com benzeno:metanol 9:1, aumentando a polaridade até 1:1 e por último apenas metanol. Desta CC foram recolhidas 33 frações de 5 mL. A subfração **SA2-1082415** (13,3 mg) rendeu **16** (Esquema 03 – página 22).

Nas demais frações observou-se por CCDA a presença das mesmas substâncias já isoladas.

### 3.1.3.3. Isolamento dos constituintes da fração em acetato de etila (SA-3)

**SA-3** foi submetida à CC rápida, eluída inicialmente com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e na sequência com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 9:1,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 8:2,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 7:3,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 1:1 e por último com metanol, rendendo 6 subfrações: **SA3-1** (1,6 mg), **SA3-2** (398,9 mg), **SA3-3** (1,29 g), **SA3-4** (983,7 mg), **SA3-5** (120,2 mg) e **SA3-6** (48,1 mg).

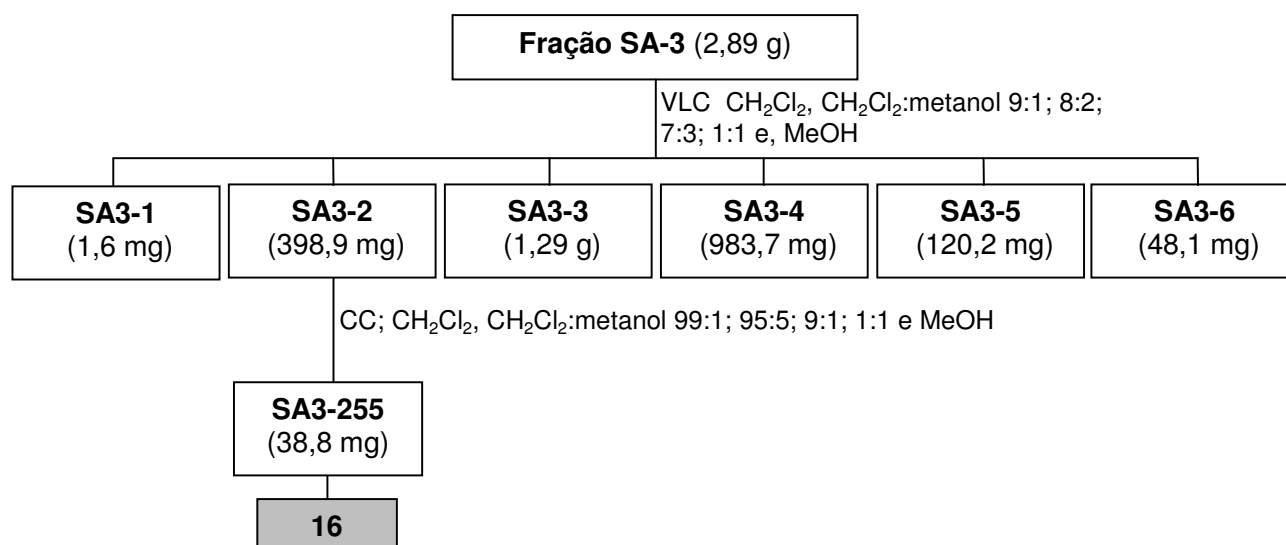
A subfração **SA3-2** (398,9 mg) foi submetida à CC, eluída primeiramente com hexano, depois com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 99:1 aumentando gradativamente a polaridade até 1:1 e por último MeOH. Foram recolhidas 85 frações de aproximadamente 5 mL as quais foram agrupadas em 9 frações, após comparação por CCDA (Tabela 06 – página 20).

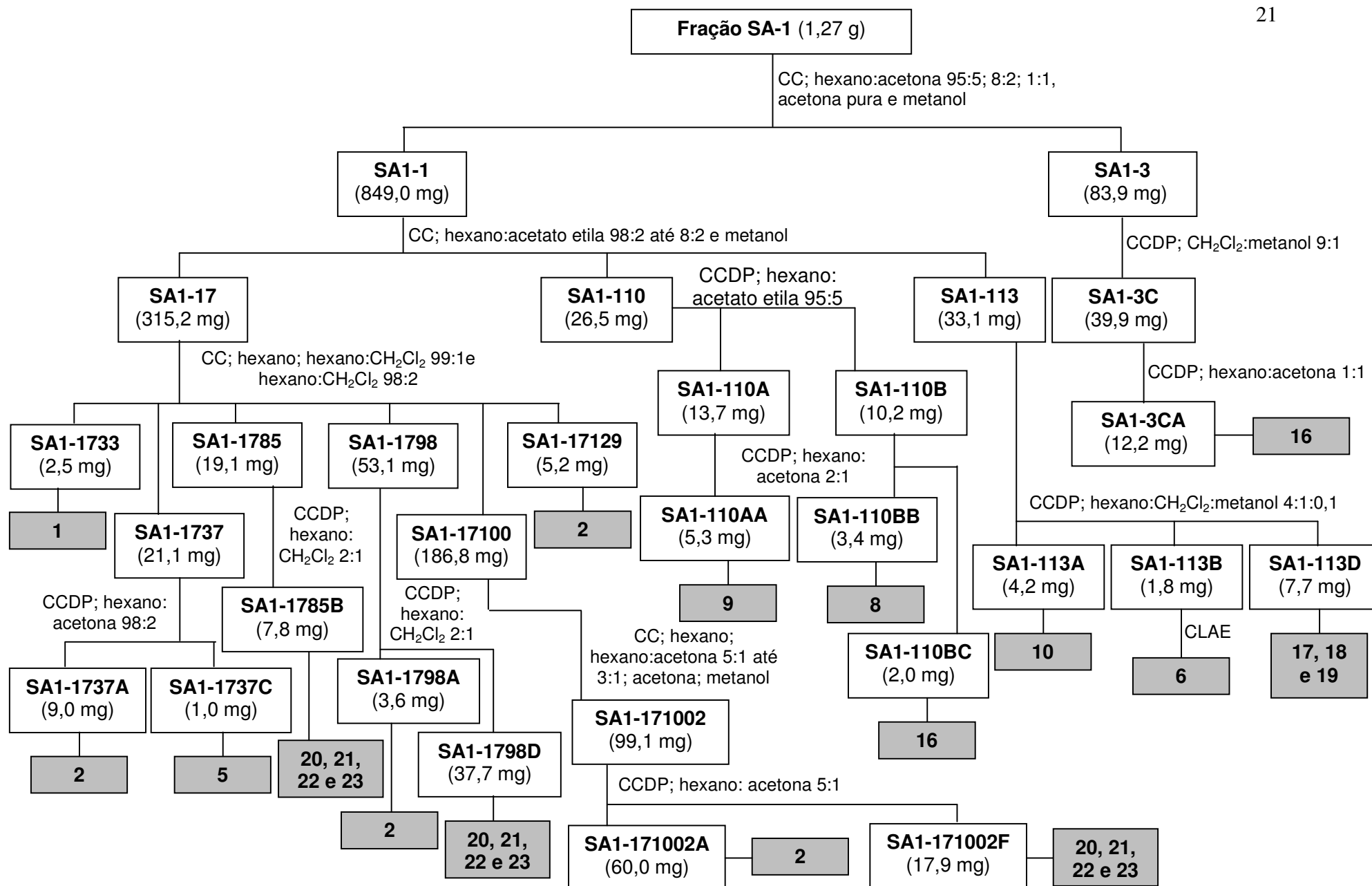
**Tabela 06 – Agrupamento das frações da coluna de SA3-2**

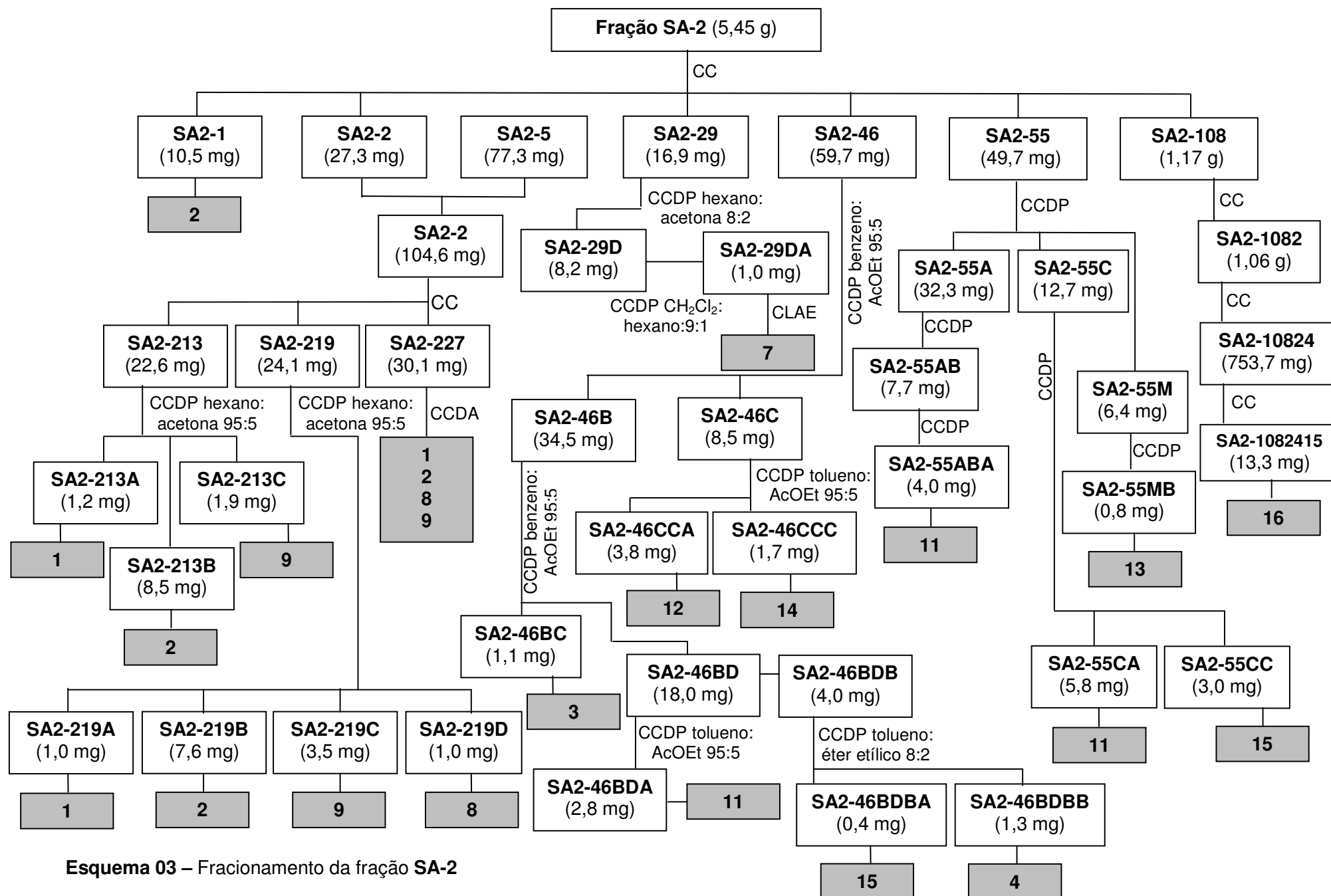
<b>Fração</b>	<b>Código</b>	<b>Solvente (v/v)</b>	<b>Massa (mg)</b>
1 – 9	SA3-22	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4,4
10-22	SA3-210	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 99:1	3,7
23-54	SA3-223	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 95:5	4,0
55	SA3-255	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 9:1	38,8
56 – 59	SA3-256	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 9:1	227,8
60 – 65	SA3-260	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 9:1	16,6
66 – 71	SA3-266	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 9:1	43,7
72- 79	SA3-272	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH 1:1	19,8
80-85	SA3-80	MeOH	7,4

A fração **SA3-255** (38,8 mg) forneceu **16** puro (Esquema 04 – página 20).

As demais frações não permitiram o isolamento de nenhuma substância pura.

**Esquema 04 – Fracionamento da fração SA-3**





Esquema 03 – Fracionamento da fração SA-2

### 3.1.4. Dados físicos e espectrométricos das substâncias isoladas

#### 1

**lapachenol:** óleo amarelo; massa molecular ( $C_{16}H_{16}O_2$ ) 240,297; RMN  $^1H$ , HSQC, HMBC: Tabela 08 – página 40; E01-04 – páginas 28-29; E05-06 – página 30.

#### 2

**8-metoxilapachenol:** óleo amarelo; massa molecular ( $C_{17}H_{18}O_3$ ) 270,323; ESI-AR  $m/z$  271,13283  $[M + H]^+$  (calculado para  $C_{17}H_{19}O_3$  271,13287) (E07 – página 32); RMN  $^1H$ ,  $^{13}C\{^1H\}$ , DEPT-135, HSQC, HMBC: Tabela 08 – página 40; E08-12 – páginas 32-34; E13-14 – página 35.

#### 3

**8-metoxi-12-hidroxilapachenol:** óleo avermelhado; massa molecular ( $C_{17}H_{18}O_4$ ) 286,322; RMN  $^1H$ , HSQC, HMBC: Tabela 08 – página 40; E15-16 – página 37; E17-18 – página 37.

#### 4

**allagophyllolideo:** sólido amarelo; massa molecular ( $C_{15}H_{12}O_4$ ) 256,253; ESI-AR  $m/z$  257,0808  $[M + H]^+$  (calculado para  $C_{15}H_{13}O_4$  257,0808) (E19 – página 41); RMN  $^1H$ , HSQC, HMBC: Tabela 09 – página 44; E20-21 – páginas 41-42; E22-23 – páginas 42-43.

#### 5

**rel-3R, 4S, 4'S-allagophyllina A:** sólido avermelhado; massa molecular ( $C_{32}H_{32}O_4$ ) 480,594; RMN  $^1H$ , HSQC, HMBC: Tabela 10 – página 49; E24-26 – páginas 46-47; E27-28 – páginas 47-48.

#### 6

**rel-S(-)-allagophyllina B:** sólido amarelo; massa molecular ( $C_{34}H_{36}O_6$ ) 540,646;  $[\alpha]_D^{25}$  -17,8° ( $c=0,00033$  g mL $^{-1}$ , MeOH). ESI-AR  $m/z$  541,2587  $[M + H]^+$  (calculado para  $C_{34}H_{37}O_6$  541,2587) (E29 – página 50). RMN  $^1H$ , HSQC, HMBC: Tabela 11 – página 53; E30-31 – página 51; E32-33 – página 52.

#### 7

**rel-S(-)-allagophyllina C:** sólido amarelo; massa molecular ( $C_{34}H_{34}O_7$ ) 554,630;  $[\alpha]_D^{25}$  -32,3° ( $c=0,0003$  g mL $^{-1}$ , MeOH). ESI-AR  $m/z$  555,2376  $[M + H]^+$  (calculado para  $C_{34}H_{35}O_7$



555,2376) (E34 – página 55). RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC: Tabela 12 – página 58; E35-37 – páginas 55-56; E38-39 – página 57.

## 8

**tectoquinona:** sólido amarelo; massa molecular ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_2$ ) 222,239; RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC: Tabela 13 – página 62; E40-42 – páginas 60-61; E43-44 – páginas 61-62.

## 9

**dunniol:** sólido vermelho; massa molecular ( $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ ) 242,270; RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC: Tabela 14 – página 67; E45-47 – páginas 64-65; E48-49 – páginas 65-66.

## 10

**S(-)- $\alpha$ -dunniona:** sólido amarelo; massa molecular ( $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ ) 242,270;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$   $-50,4^\circ$  ( $c=0,00026 \text{ g mL}^{-1}$ , MeOH), lit.  $-90^\circ$ , CAI *et al.*, 2005. DC ( $c=0,008$ , MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Theta$ ): 206 (+10,7); 224 (+0,5); 236 (+4,6); 252 (-3,9); 286 (-5,3); 314 (+0,5); 381 (-3,3); 436 (+3,3). RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC: Tabela 15 – página 80; E50-53 – páginas 68-70; E54-55 – página 71.

## 11

**S(-)-8-hidroxdunniona:** sólido vermelho; massa molecular ( $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ) 258,269;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$   $-179,1^\circ$  ( $c=0,00036 \text{ g mL}^{-1}$ , MeOH), lit. inativo, INOUE *et al.*, 1982. DC ( $c=0,013$ , MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Theta$ ): 227 (+3,8); 251 (-3,1); 321 (+1,2); 450 (-3,6). RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , DEPT-135, HSQC, HMBC: Tabela 15 – página 80; E56-59 – páginas 73-75; E60-61 – páginas 75-76.

## 12

**S(-)-dunniona:** sólido alaranjado; massa molecular ( $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ ) 242,270;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$   $-208^\circ$  ( $c=0,0001 \text{ g mL}^{-1}$ , MeOH), lit. + 310, COOKE *et al.*, 2006. DC ( $c=0,00146$ , MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Theta$ ): 208 (+5,8); 226 (-1,8); 334 (+0,7); 441 (-1,0). RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , HSQC, HMBC: Tabela 15 – página 80; E62-63 – páginas 77-78; E64-65 – páginas 78-79.

## 13

**rel-2'S, 1S(-)-allagophyllona:** sólido vermelho; massa molecular ( $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_4$ ) 300,349;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$   $-3,75^\circ$  ( $c=0,00016 \text{ g mL}^{-1}$ , MeOH). DC ( $c=0,026$ , MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\Theta$ ): 205 (+8,1). ESI-AR  $m/z$  301,1435  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_4$  301,1435) (E66 – página 82). RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC: Tabela 16 – página 85; E67-68 – páginas 82-83; E69-70 – página 84.

**14**

**1S, 3'R(+)-aggregatina E:** óleo amarelo; massa molecular ( $C_{15}H_{14}O_4$ ) 258,269;  $[\alpha]_D^{25} +7,23^\circ$  ( $c=0,053 \text{ g mL}^{-1}$ ,  $CHCl_3$ ). ESI-AR  $m/z$  265,10477  $[M + Li]^+$  (calculado para  $C_{15}H_{14}O_4Li$  265,10477) (E78 – página 92). RMN  $^1H$ , HSQC, HMBC: Tabela 17 – página 93; E71 e 73 – páginas 87-89; E74-75 – páginas 88-90.

**15**

**1R, 3'S(-)-6-Metoxiaggregatina E:** óleo amarelo; massa molecular ( $C_{16}H_{16}O_5$ ) 288,295;  $[\alpha]_D^{25} -8^\circ$  ( $c=0,0002 \text{ g mL}^{-1}$ , MeOH). ESI-AR  $m/z$  295,11508  $[M + Li]^+$  (calculado para  $C_{16}H_{16}O_5Li$  295,11508) (E79 – página 92). RMN  $^1H$ , HSQC, HMBC: Tabela 17 – página 93; E72-73 – páginas 88-89; E76-77 – páginas 90-91.

**16**

**halleridona:** óleo avermelhado; massa molecular ( $C_8H_{10}O_3$ ) 154,163; RMN  $^1H$ ,  $^{13}C\{^1H\}$ , DEPT-135, HSQC, HMBC: Tabela 18 – página 100; E80-86 – páginas 95-98; E87-88 – páginas 98-99.

**17 + 18 + 19**

**cedrol:** massa molecular ( $C_{15}H_{26}O$ ) 222,366;  **$\alpha$ -muurolol:** massa molecular ( $C_{15}H_{26}O$ ) 222,366 e **8-cedren-13-ol:** massa molecular ( $C_{15}H_{24}O$ ) 220,350, sólido incolor; RMN  $^1H$ ,  $^{13}C\{^1H\}$ , DEPT-135, HSQC, HMBC: Tabela 19 – página 105; E89-93 – páginas 102-104; E94-95 – páginas 104-105; CG-EM (Figura 21 – página 101).

**20 + 21 + 22 + 23**

**oleato de sitosterila:** massa molecular ( $C_{47}H_{82}O_2$ ) 679,153; **linoleato de sitosterila:** massa molecular ( $C_{47}H_{80}O_2$ ) 677,137; **oleato de estigmasterila:** massa molecular ( $C_{47}H_{80}O_2$ ) 677,137 e **linoleato de estigmasterila:** ( $C_{47}H_{78}O_2$ ) 675,121, agulhas incolores. ESI-AR  $m/z$  675,60674  $[M + H]^+$  (calculado para  $C_{47}H_{79}O_2$  675,60674),  $m/z$  679,49115  $[M + H]^+$  (calculado para  $C_{47}H_{83}O_2$  679,49115),  $m/z$  677,47534  $[M + H]^+$  (calculado para  $C_{47}H_{81}O_2$  677,4734) (E105 – página 112); RMN  $^1H$ ,  $^{13}C\{^1H\}$ , DEPT-135, HSQC, HMBC: Tabelas 20-21 – página 113; E96-102 – páginas 108-111; E103-104 – páginas 111-112.

### 3.2. Resultados e Discussão

O estudo fitoquímico dos tubérculos de *Sinningia allagophylla* rendeu 23 substâncias, que foram identificadas por técnicas espectrométricas (RMN e EM), além de comparação com dados da literatura (Tabela 07 – página 26).

**Tabela 07** – Substâncias isoladas de *Sinningia allagophylla*

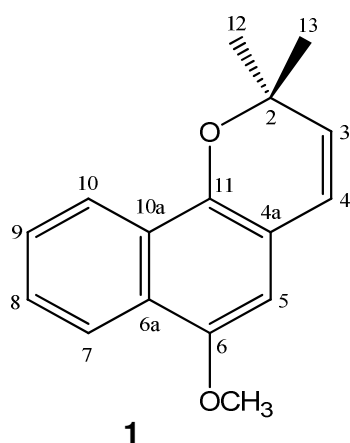
Substância	Massa (mg)
1	4,7
2	104,4
3	1,1
4	1,3
5	1,0
6	1,8
7	1,0
8	4,4
9	10,7
10	4,2
11	12,6
12	3,8
13	0,8
14	1,7
15	3,4
16	52,1
17 + 18 + 19	7,7
20 + 21 + 22 + 23	63,4

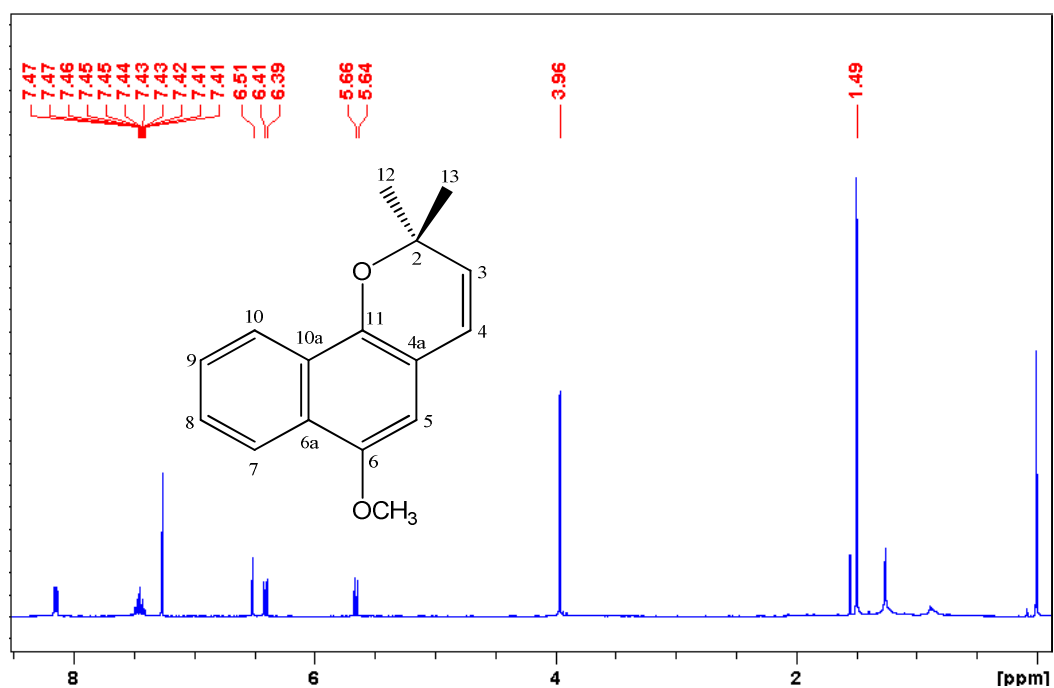
#### 3.2.1. Identificação de 1 e determinação estrutural de 2, 3 e 4 – Cromenos

A substância 1 foi isolada como um óleo amarelo. O seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E01 – página 28) apresentou sinais de cinco hidrogênios aromáticos ( $\delta$  7,45 – 8,14, *m*, 4 H) (E02-03 – páginas 28 e 29), sendo quatro deles com acoplamentos típicos de um anel 1,2-dissubstituído e um outro isolado ( $\delta$  6,51, *s*), juntamente com o sinal de um grupo metoxila ( $\delta$  3,96, *s*), sugerindo a presença de dois anéis aromáticos. Também foram observados sinais de dois hidrogênios olefínicos isolados ( $\delta$  6,40 e 5,65, *d*,  $J = 9,7$  Hz) (E04 – página 29), e de

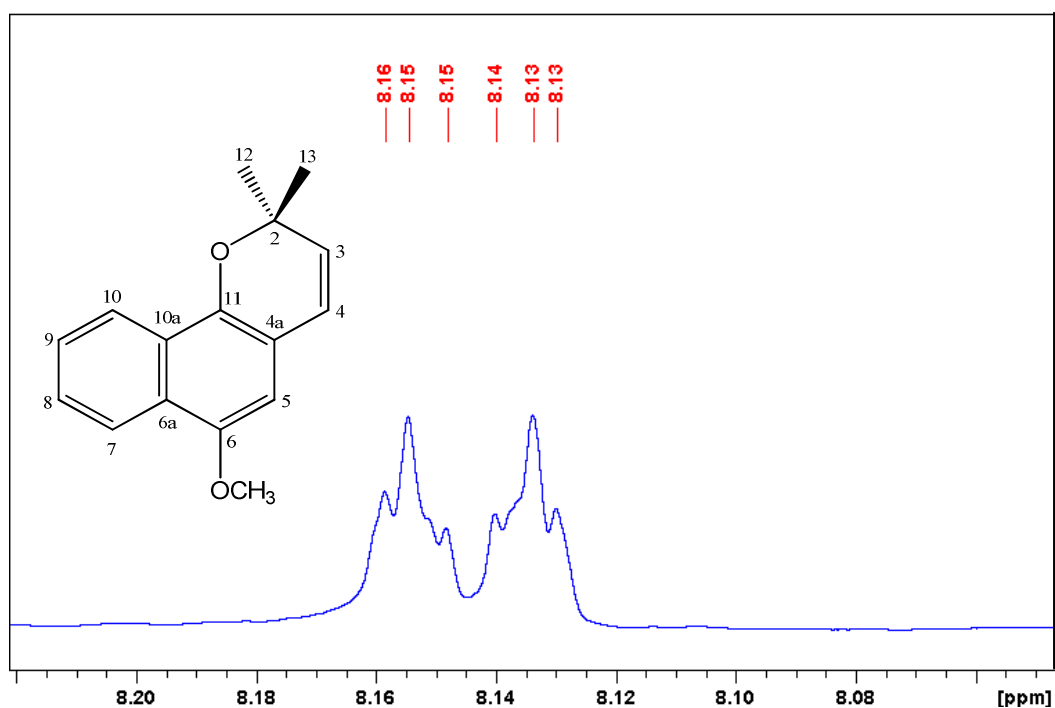
dois grupos metila equivalentes ( $\delta$  1,49, s), característico de um sistema 2,2-dimetilpirano. Devido a pequena quantidade não foi possível a obtenção de um espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado, mas através do mapa de correlação a uma ligação (HSQC) e do mapa de correlação a longa distância (HMBC) (E05-06 – página 30, Figura 06 – página 31) pode-se confirmar a presença do anel 2,2-dimetilpirano através dos sinais em  $\delta$  76,3 (carbono oxigenado),  $\delta$  27,6 (grupos metila) e  $\delta$  123,1 e 129,9 (carbonos da ligação dupla) (SILVA e PINTO, 2005). Foram ainda observados sinais de 10 carbonos  $\text{sp}^2$  ( $\delta$  102,6 – 142,0), sugerindo que os dois anéis aromáticos estavam fundidos, como no naftaleno. A análise cuidadosa dos espectros HSQC e HMBC (Tabela 08 – página 40) permitiu deduzir a estrutura **1**.

Uma pesquisa na literatura mostrou que **1** é uma substância conhecida como lapachenol, e já isolada de espécies das famílias Rubiaceae, Bigoniaceae e Verbenaceae (REIBENSPIES *et al.*, 1989).

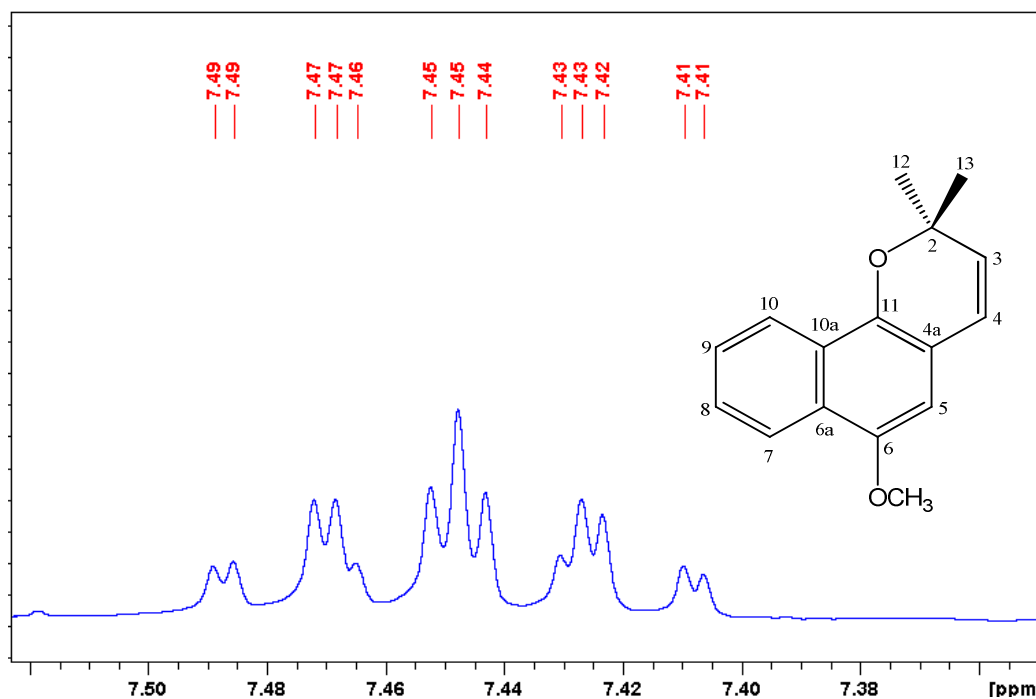




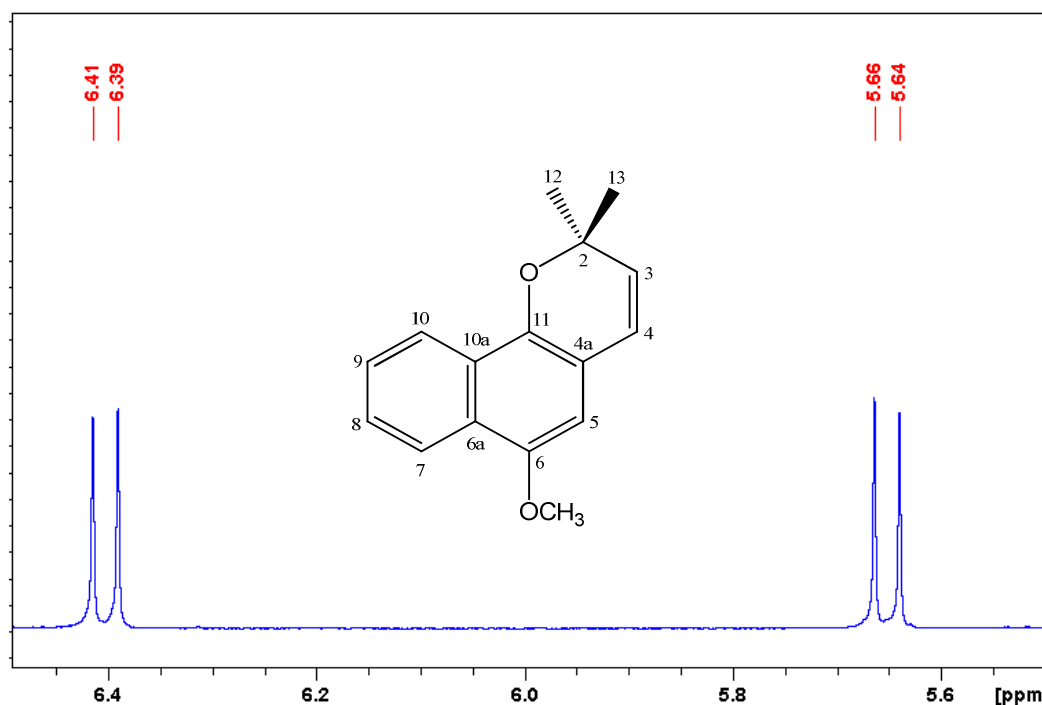
**E01** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **1** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



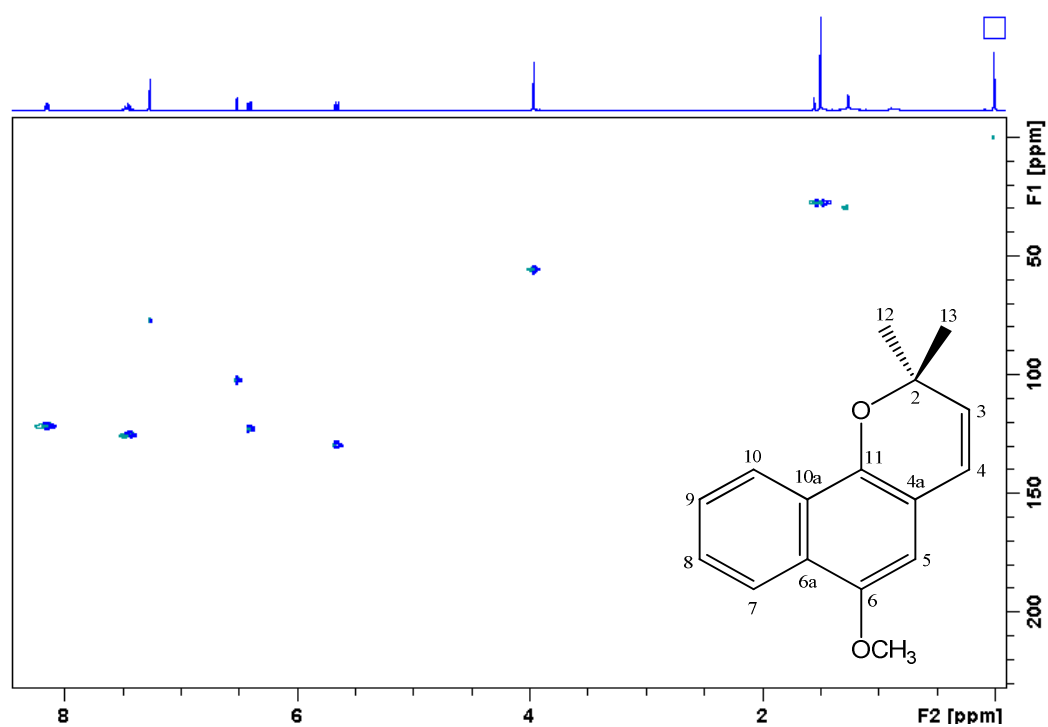
**E02** – Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **1** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



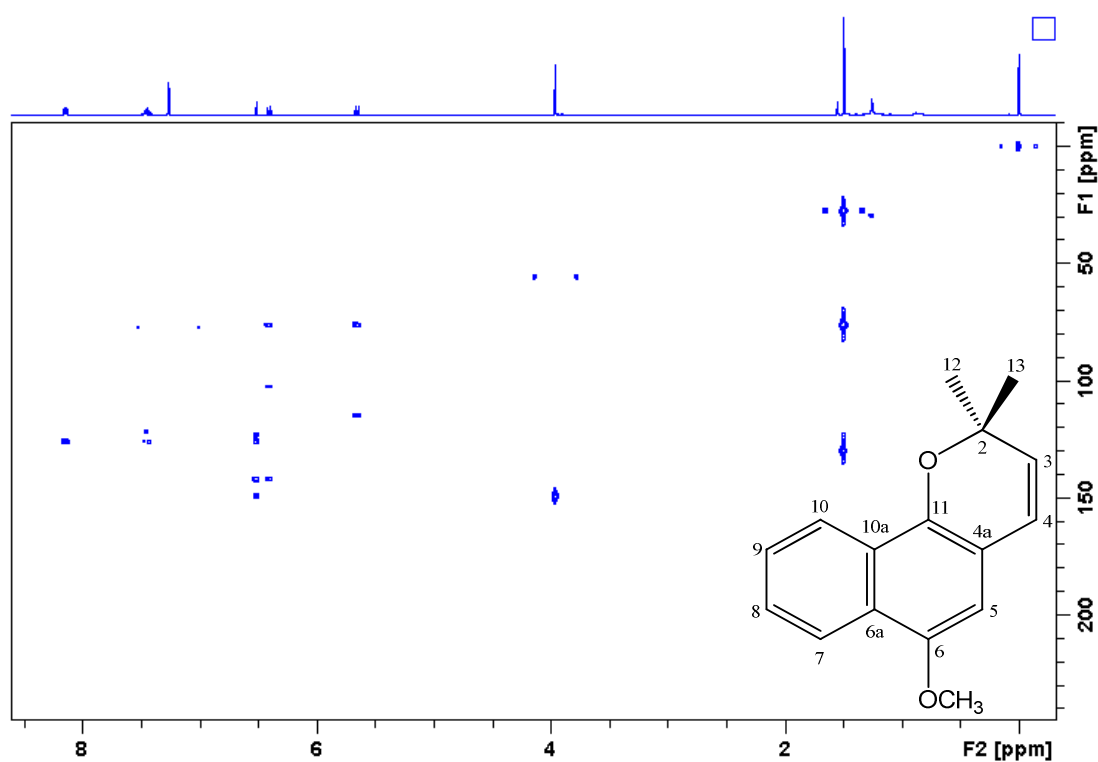
**E03** – Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **1** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



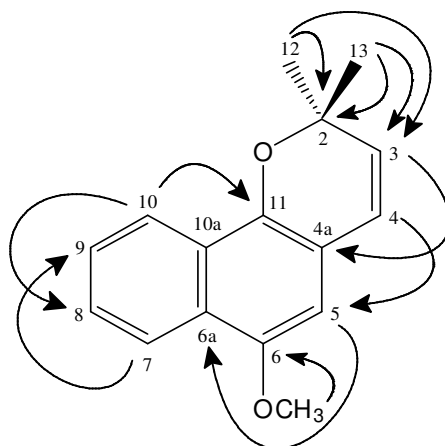
**E04** – Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **1** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E05** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação de **1** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



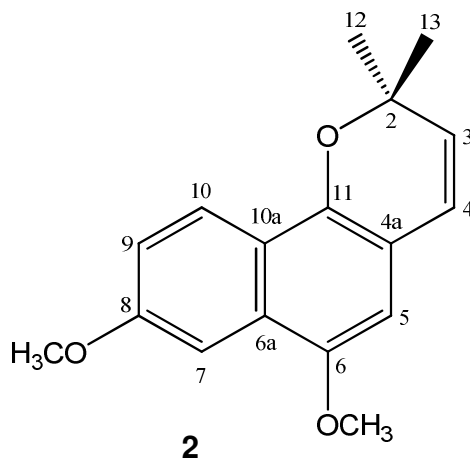
**E06** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **1** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



**Figura 06** – Principais correlações observadas no Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **1**

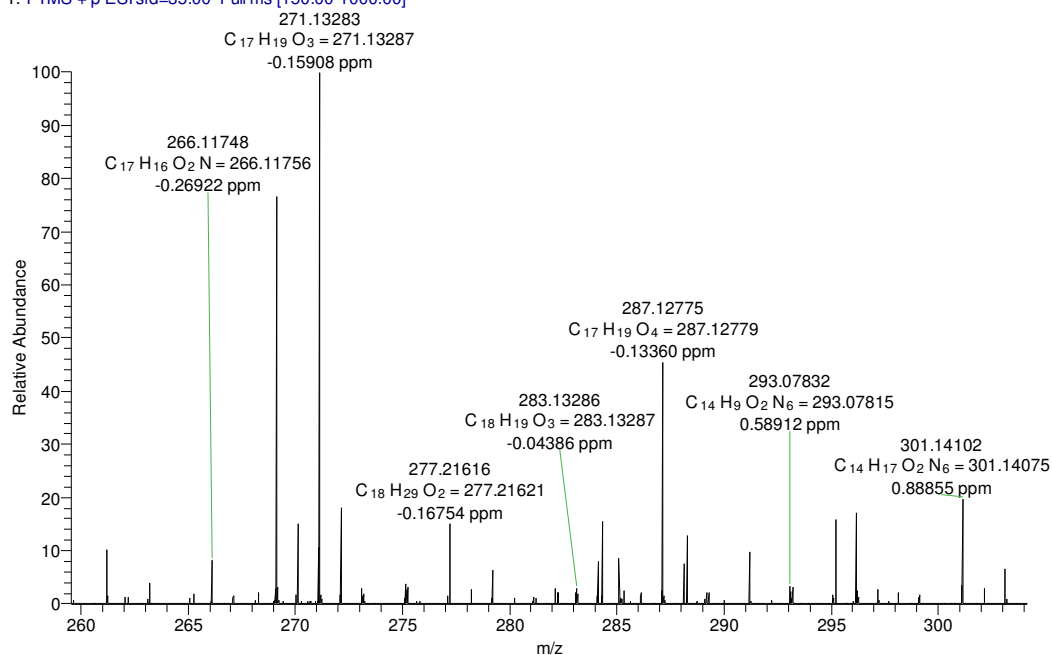
A substância **2** foi isolada como um óleo amarelo. O seu espectro de massas de alta resolução apresentou um pico em  $m/z$  271,13283 ( $[\text{M}+1]^+$ ), indicando a fórmula  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_3$  (E07 – página 31). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E08 – página 32) foi muito semelhante ao da substância **1**. A principal diferença foi a presença de dois sinais de grupos metoxila ( $\delta$  3,94 e 3,92, s) (E09 – página 32) e de três hidrogênios aromáticos, com padrão de acoplamento característico de um anel 1,2,4-trissubstituído  $\delta$  8,06 ( $d$ , 9,1 Hz), 7,44 ( $d$ , 2,6 Hz) e 7,11 ( $dd$ , 9,1 e 2,6 Hz) (E10 – página 33). Esses dados sugeriram um derivado de **1**, com substituição na posição 8. A estrutura proposta **2** foi confirmada pelos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  (E11 – página 33), DEPT-135 (E12 – página 34) e pela análise dos mapas de correlação a uma ligação HSQC (E13 – página 34) e a longa distância HMBC (E14 – página 35, Figura 07 – página 36, Tabela 08 – página 40).

Esta substância é inédita na literatura e foi denominada 8-metoxilapachenol.

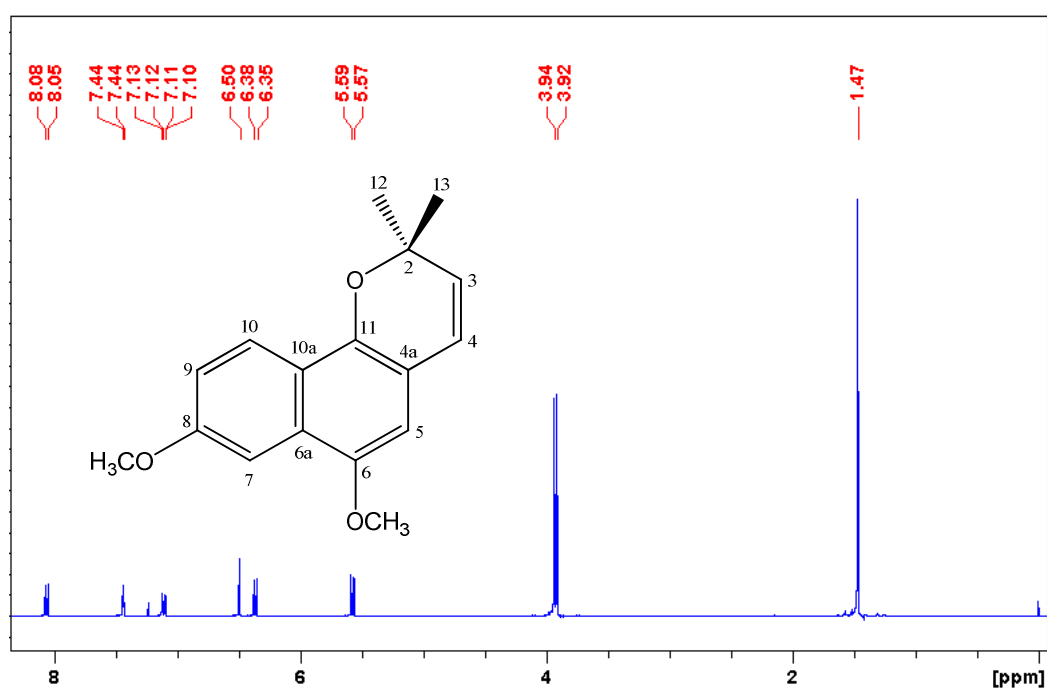


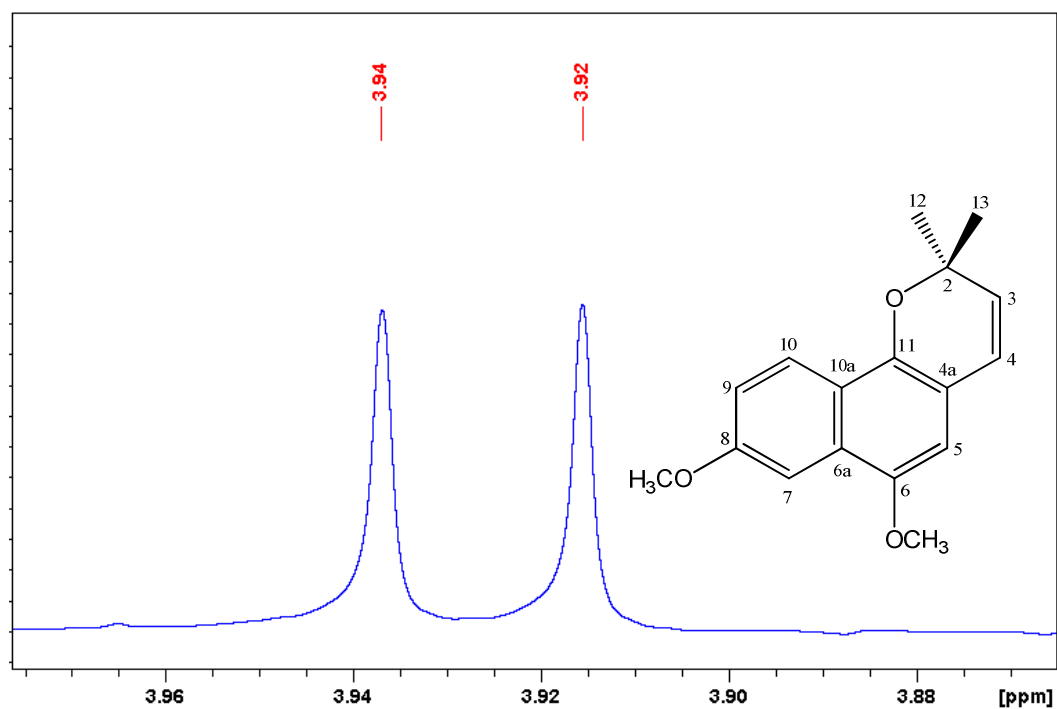


Sal\_220\_posit\_ok #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 3.19E4  
T: FTMS + p ESI sid=35.00 Full ms [150.00-1000.00]

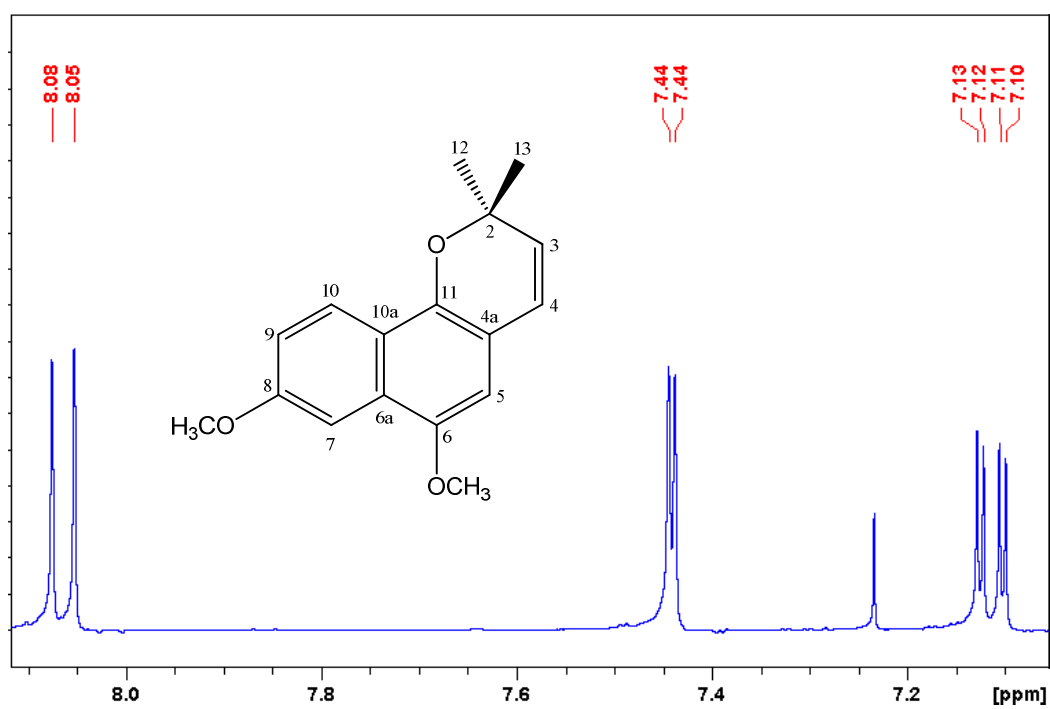


**E07 – Espectro de massas de alta resolução da substância 2**

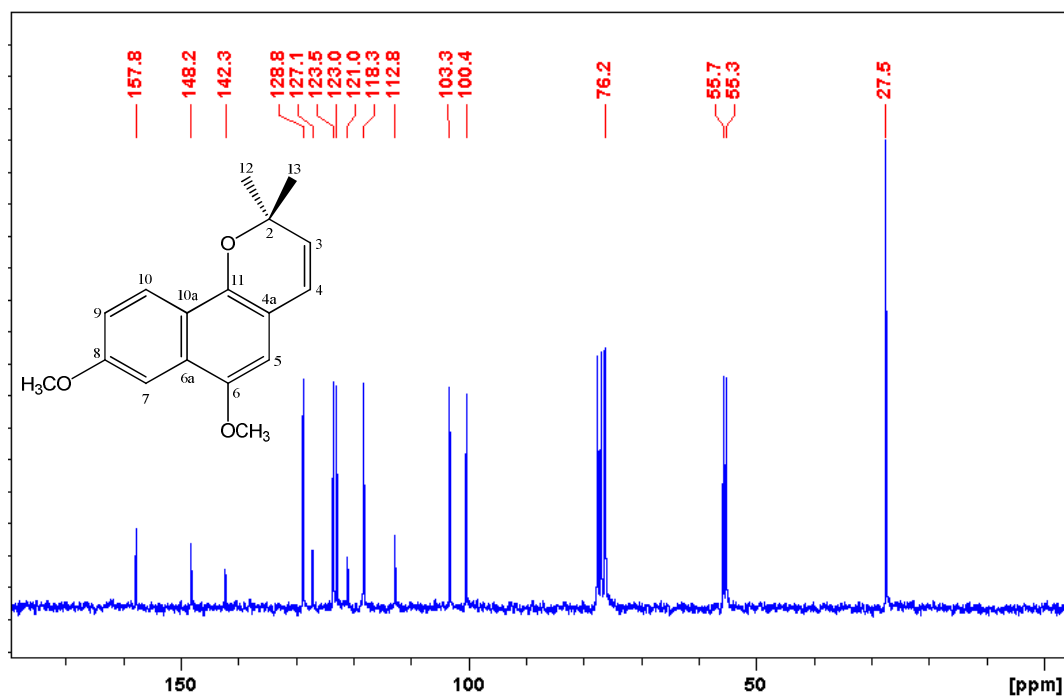




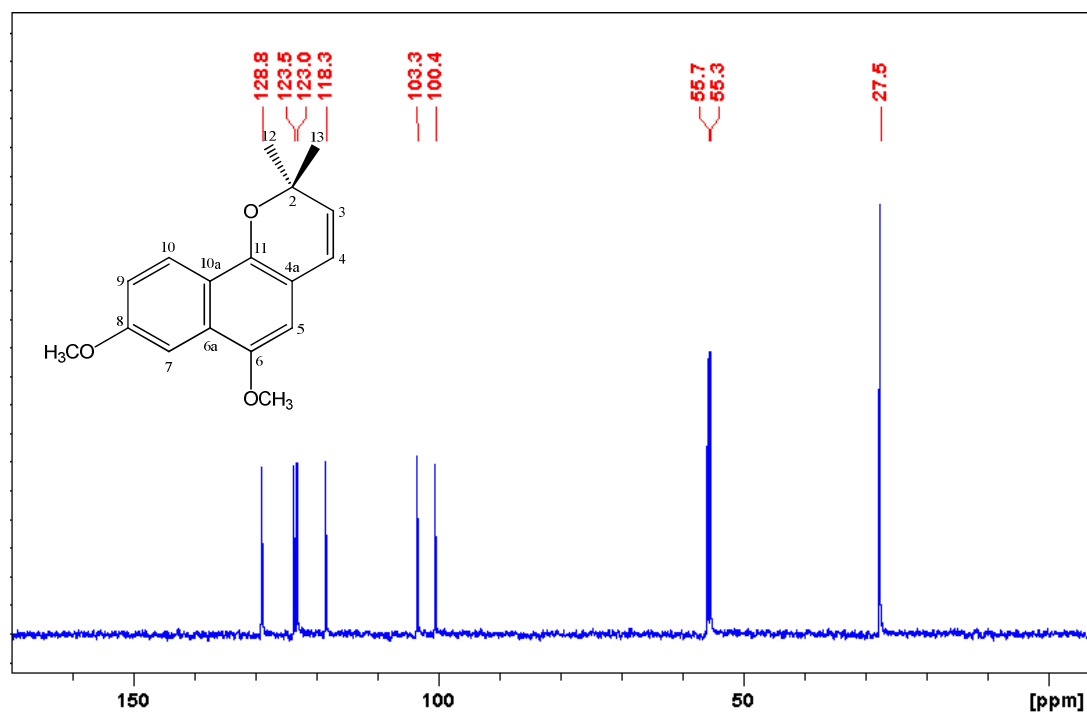
**E09** – Ampliação da região das metoxilas do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



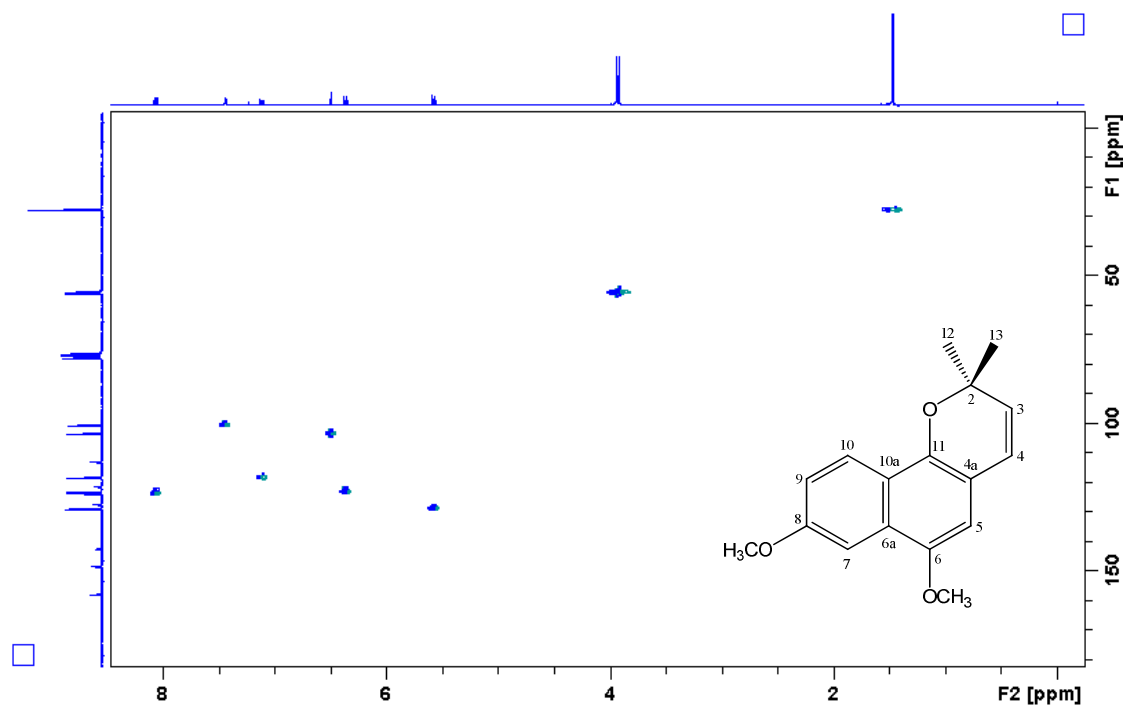
**E10** – Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



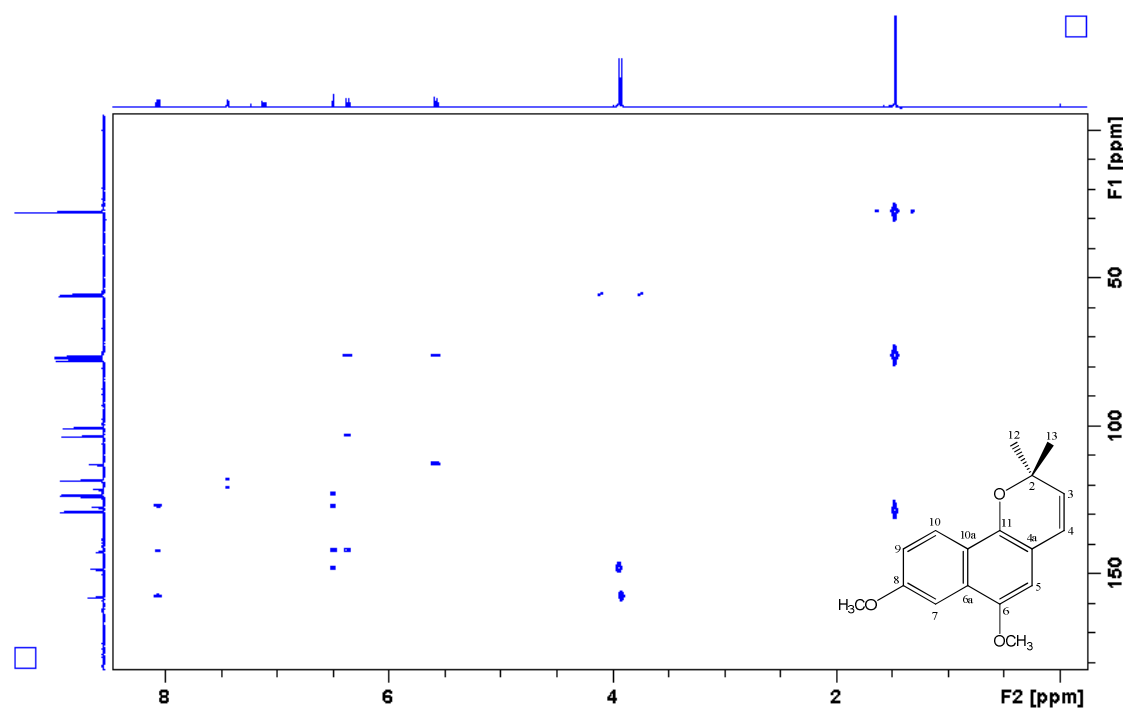
**E11** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  de **2** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)



**E12** – Espectro de RMN de DEPT-135 de **2** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)

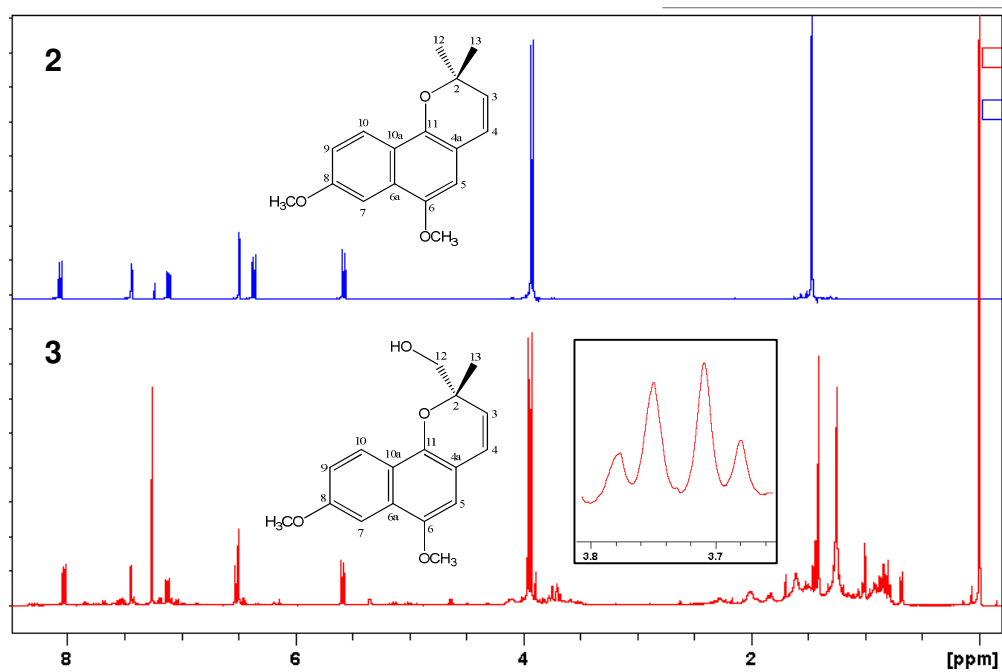
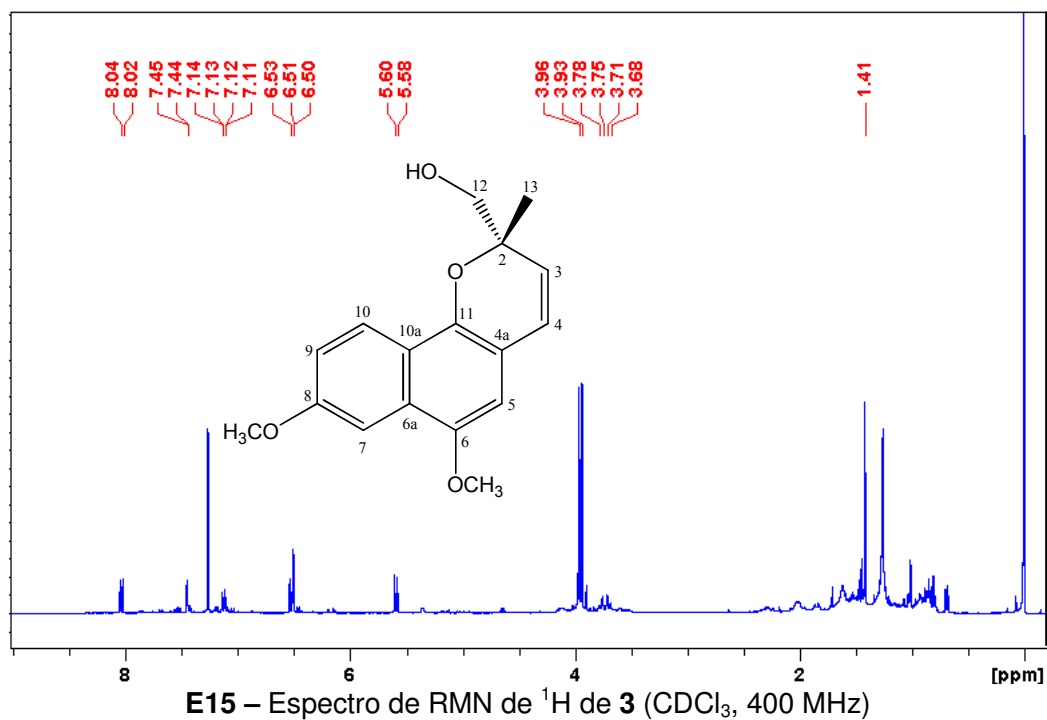


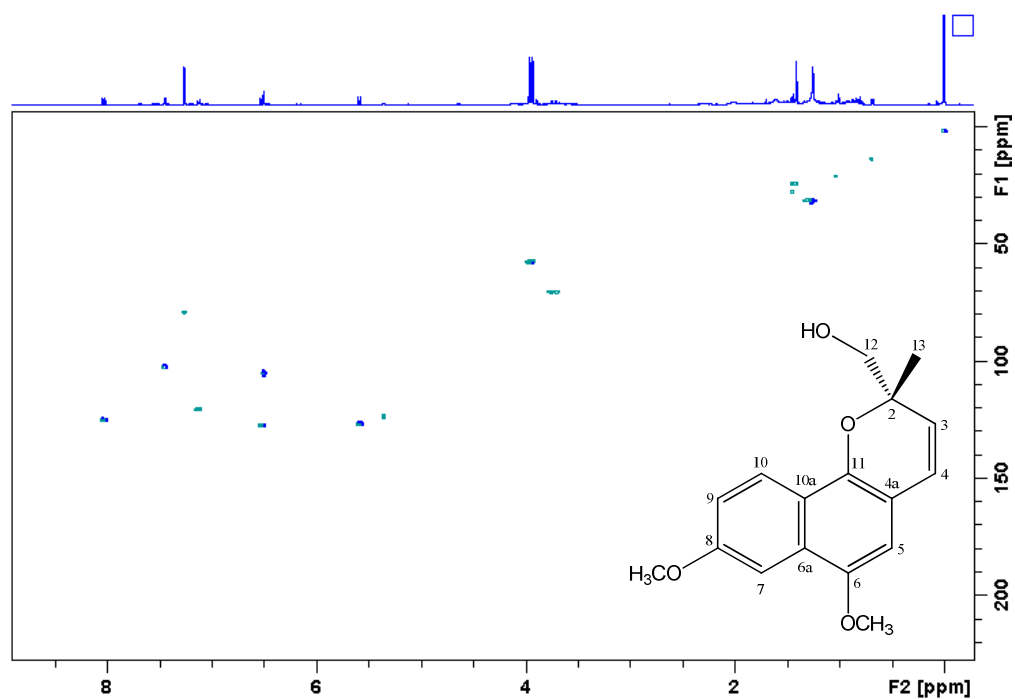
**E13** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação de **2** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



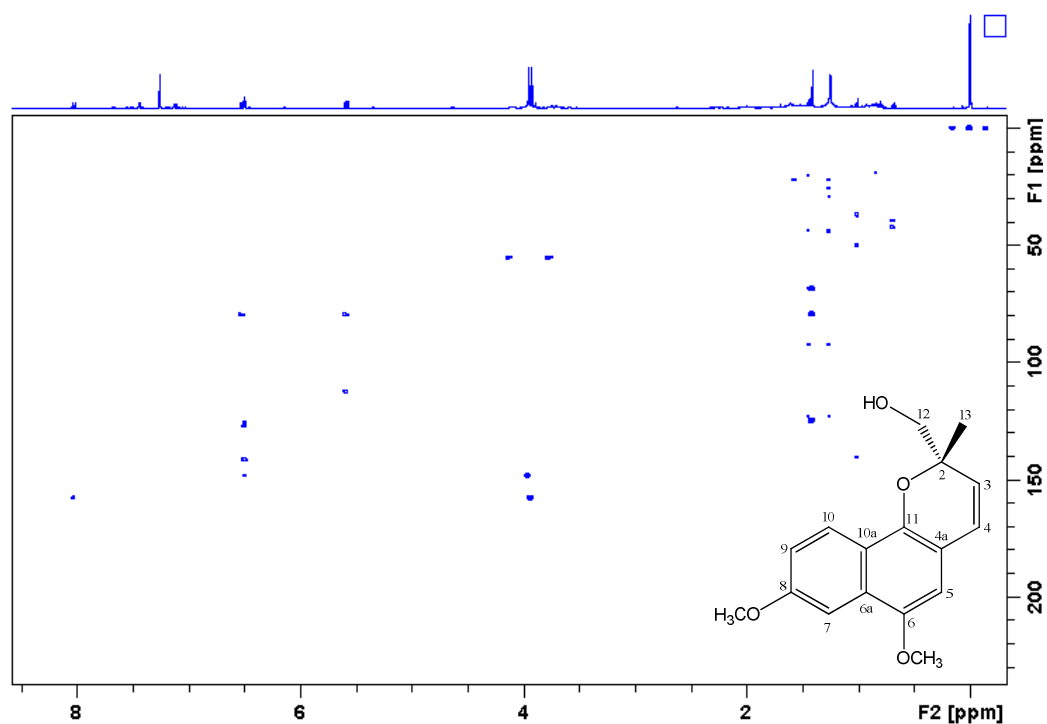
**E14** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **2** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)







**E17** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação de **3** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



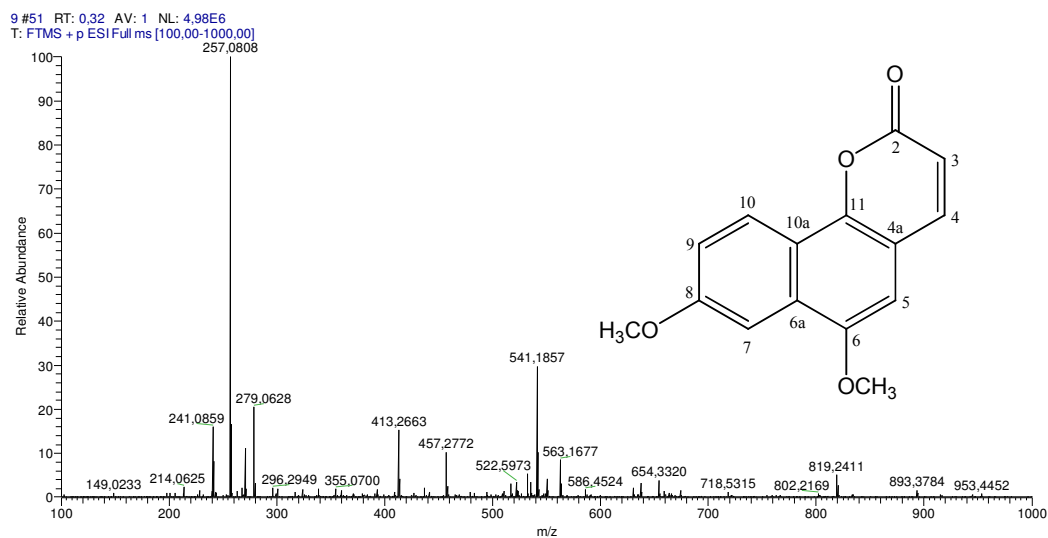
**E18** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **3** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



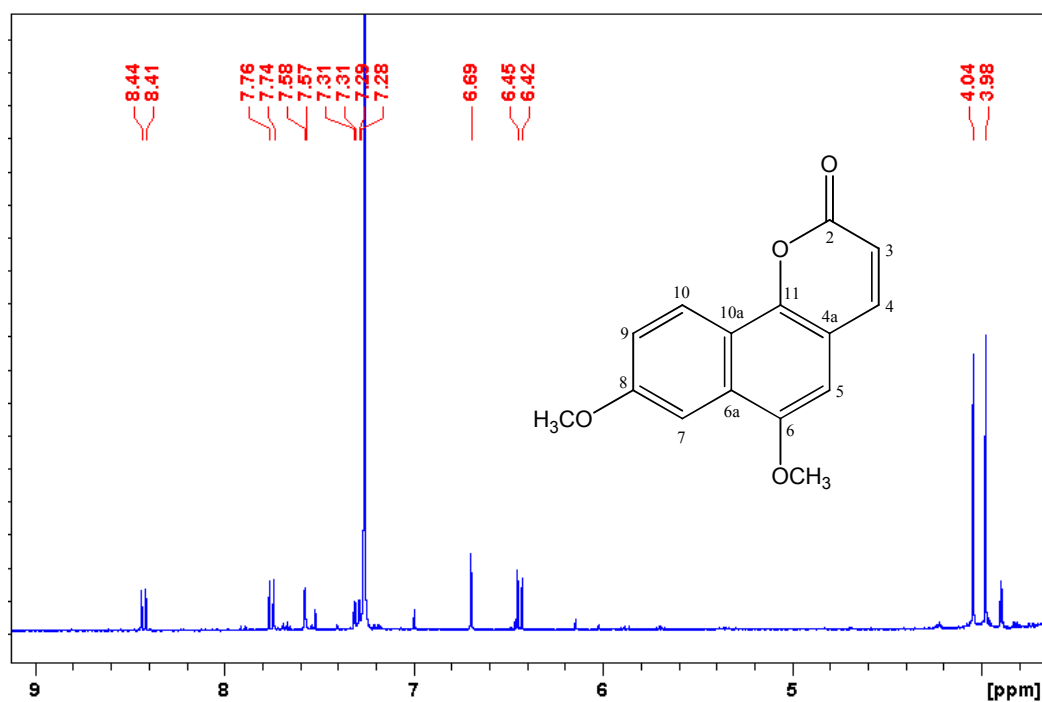


**Tabela 08** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$  de **1**, **2** e **3** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

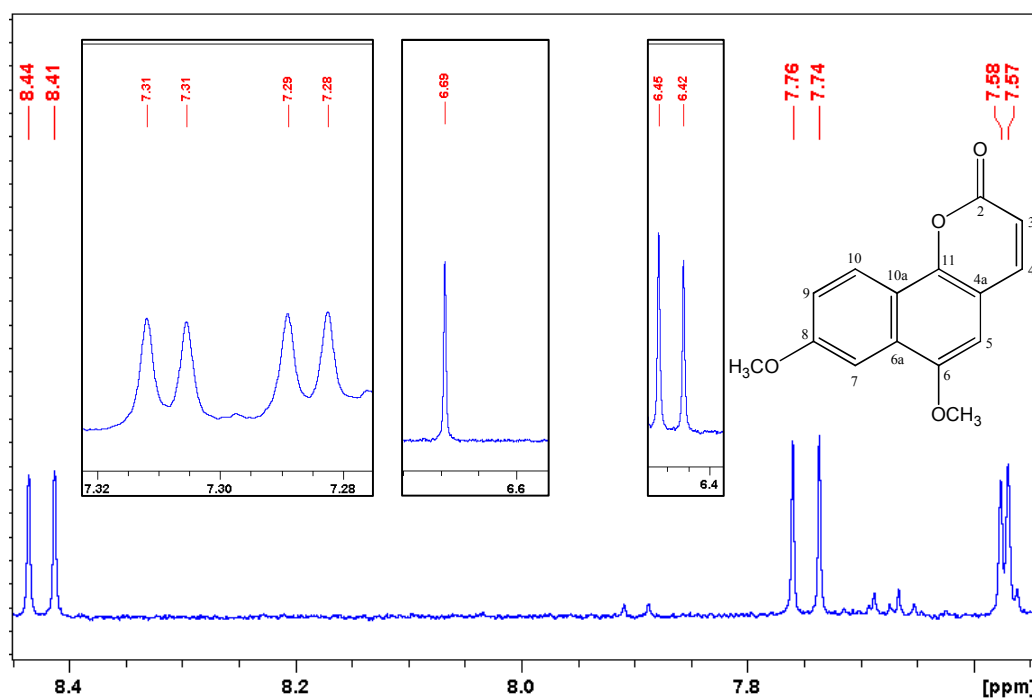
Posição	<b>1</b>			<b>2</b>			<b>3</b>		
	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	76,3	-	-	76,2	-	-	79,6	-
3	5,65 ( <i>d</i> , 9,7)	129,9	2, 12, 13, 4a	5,60 ( <i>d</i> , 9,7)	128,8	2, 4a, 12, 13	5,59 ( <i>d</i> , 9,7)	125,1	2, 4a
4	6,40 ( <i>d</i> , 9,7)	123,1	2, 5, 4a, 11	6,38 ( <i>d</i> , 9,7)	123,0	2, 4a, 5, 11	6,52 ( <i>d</i> , 9,7)	125,7	2, 5, 4a, 11
4a	-	114,9	-	-	112,8	-	-	112,6	-
5	6,51 ( <i>s</i> )	102,6	4, 6a, 11, 6	6,50 ( <i>s</i> )	103,3	4, 6, 6a, 11	6,50 ( <i>s</i> )	103,5	4, 6a, 11, 6
6	-	149,3	-	-	148,3	-	-	148,6	-
6a	-	126,0	-	-	127,2	-	-	127,3	-
7	8,14 ( <i>m</i> )	121,8	8, 9, 6	7,44 ( <i>d</i> , 2,6)	100,4	6, 8, 9, 10a	7,45 ( <i>d</i> , 2,6)	100,8	9, 10a, 6, 8
8	7,45 ( <i>m</i> )	125,8	7, 9, 10	-	157,8	-	-	157,9	-
9	7,45 ( <i>m</i> )	125,8	7, 8, 10	7,11 ( <i>dd</i> , 9,1; 2,6)	118,3	7, 8, 10a	7,12 ( <i>dd</i> , 9,1; 2,6)	118,7	7, 10a
10	8,14 ( <i>m</i> )	121,8	8, 9, 11	8,06 ( <i>d</i> , 9,1)	123,5	6a, 8, 11	8,03 ( <i>d</i> , 9,1)	123,3	6a, 11, 8
10a	-	126,0	-	-	121,0	-	-	120,7	-
11	-	142,0	-	-	142,3	-	-	141,4	-
12	1,49 ( <i>s</i> )	27,6	2, 3, 13	1,48 ( <i>s</i> )	27,5	2, 3, 13	3,69 e 3,76 ( <i>d</i> , 11,6)	68,5	3
13	1,49 ( <i>s</i> )	27,6	2, 3, 12	1,48 ( <i>s</i> )	27,5	2, 3, 12	1,41 ( <i>s</i> )	22,3	12, 2, 3
H <sub>3</sub> CO-6	3,96 ( <i>s</i> )	55,9	6	3,94 ( <i>s</i> )	55,7	6	3,96 ( <i>s</i> )	55,8	6
H <sub>3</sub> CO-8	-	-	-	3,92 ( <i>s</i> )	55,3	8	3,93 ( <i>s</i> )	55,5	8



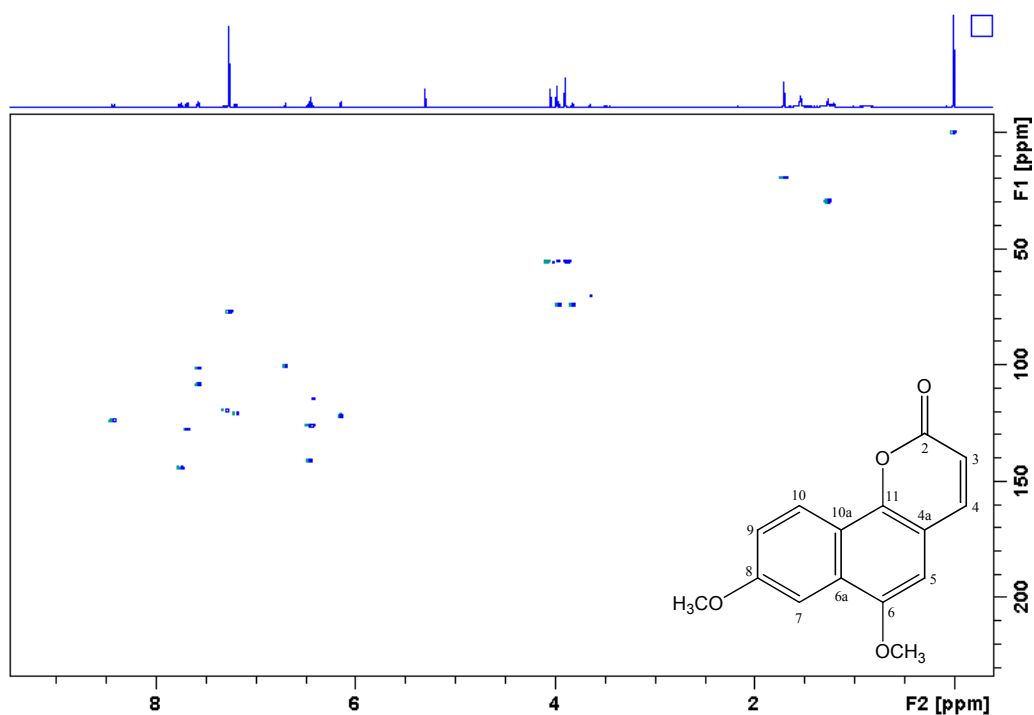
E19 – Espectro de massas de alta resolução da substância 4



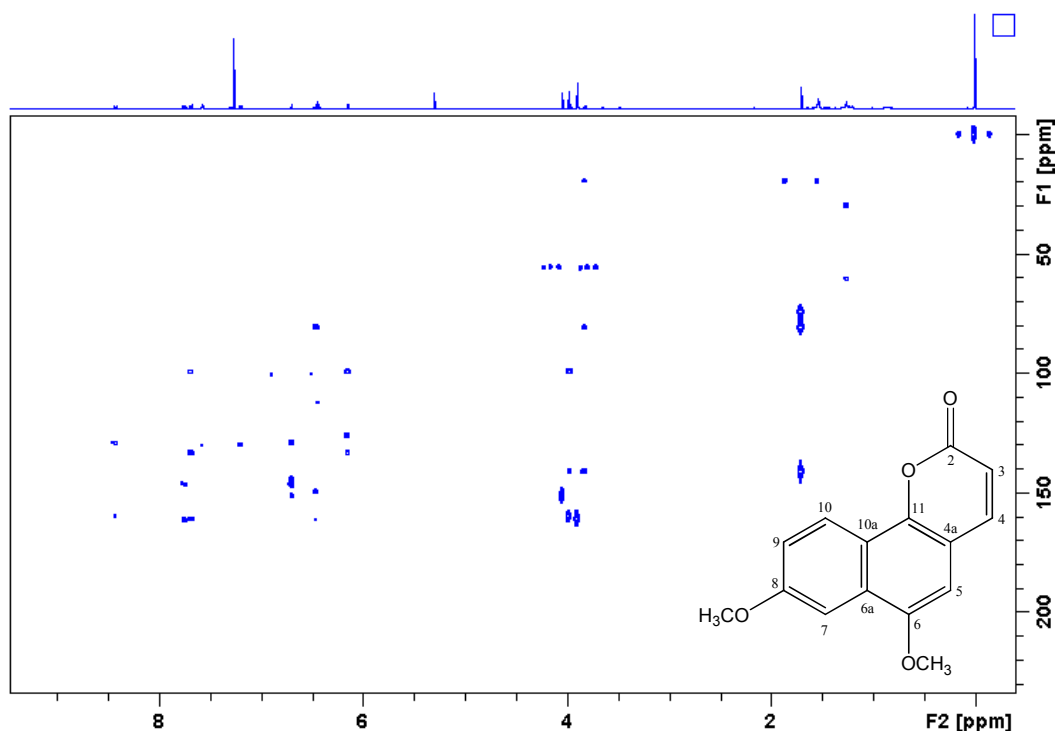
E20 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 4 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



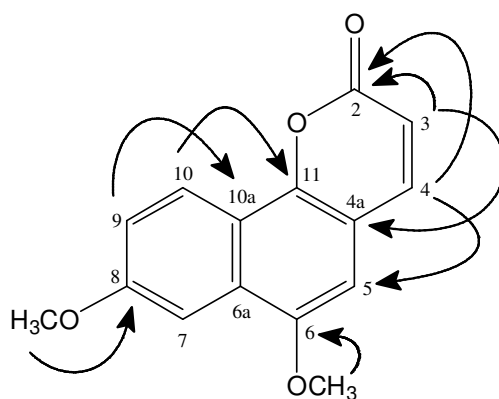
**E21** – Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos e olefínicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E22** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação de **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E23** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**Figura 09** – Principais correlações observadas no Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **4**

**Tabela 09** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$  de **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

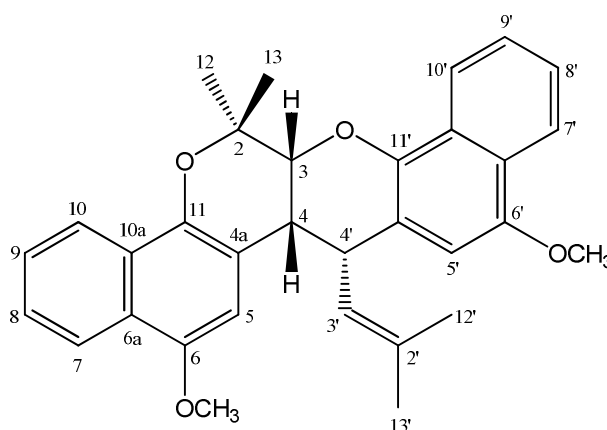
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (m, $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$
2	-	161,2	-
3	6,47 ( <i>d</i> , 9,4)	114,9	5, 4a, 2
4	7,74 ( <i>d</i> , 9,4)	144,5	5, 11, 2
4a	-	112,4	-
5	6,69 ( <i>s</i> )	100,5	6a, 4, 11, 6
6	-	151,2	-
6a	-	129,2	-
7	7,57 ( <i>d</i> , 2,6)	101,6	10a, 6
8	-	159,9	-
9	7,30 ( <i>dd</i> , 9,2; 2,6)	119,9	10a
10	8,42 ( <i>dd</i> , 9,2; 0,3)	124,2	6a, 11, 8
10a	-	118,8	-
11	-	146,5	-
$\text{H}_3\text{CO}$ -6	4,04 ( <i>s</i> )	55,8	6
$\text{H}_3\text{CO}$ -8	3,97 ( <i>s</i> )	55,6	8

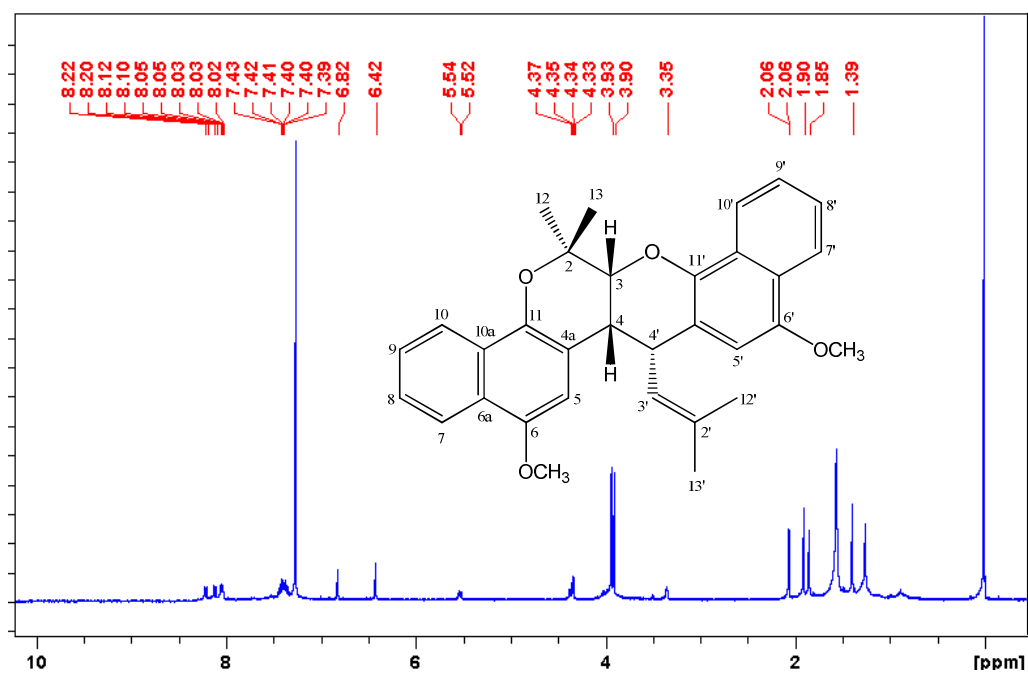
### 3.2.2. Determinação estrutural de **5**, **6** e **7** - Cromenos diméricos

Estas três substâncias foram isoladas como sólidos, sendo **5** avermelhado e **6** e **7** amarelos e seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  apresentaram sinais de hidrogênios aromáticos, grupos metoxila e metila, lembrando os cromenos **1** e **2**.

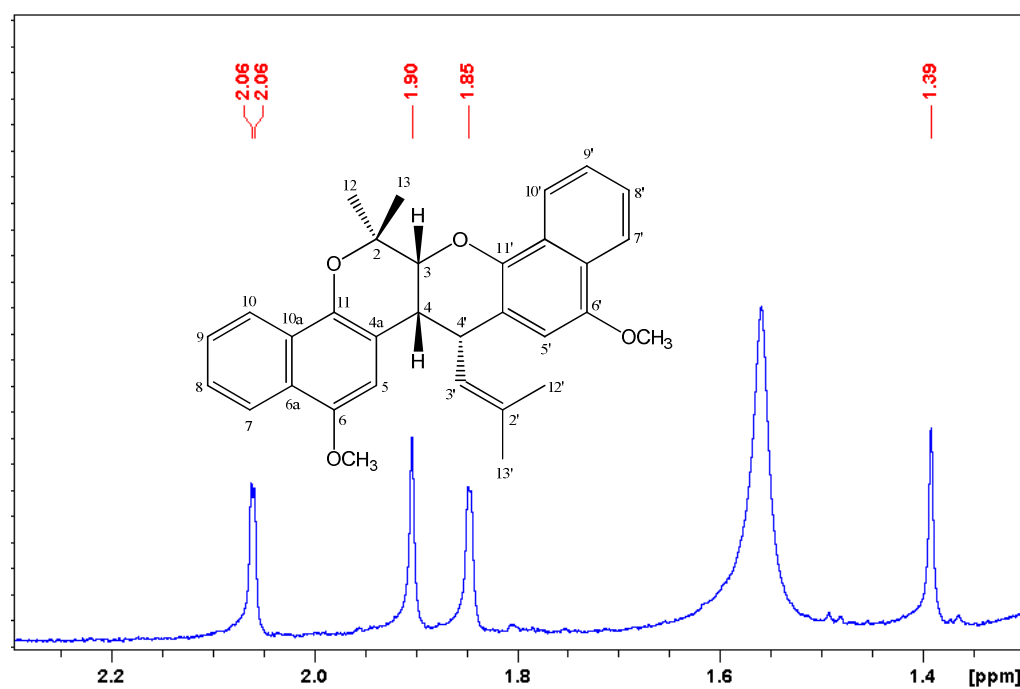
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **5** (E24 – página 46) mostrou, entre outros, sinais de quatro grupos metila ( $\delta$  1,39, 1,85, 1,90 e 2,06) (E25 – página 46), de dois grupos metoxila ( $\delta$  3,90 e 3,93), além de 10 hidrogênios de anéis aromáticos, sendo dois simpletos de um hidrogênio cada ( $\delta$  6,42 e 6,82), um multipeto com 4 hidrogênios ( $\delta$  7,38), outro multipeto de 2 hidrogênios ( $\delta$  8,04) e dois dupletos com 1 hidrogênio cada ( $\delta$  8,11 e 8,21) (E26 – página 47). A duplicidade dos sinais sugeriu uma estrutura aromática dimérica. O grupo 2-metil-2-propenila foi deduzido dos sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\delta$  1,85 (*d*, 0,8 Hz), 2,06 (*d*, 1,2 Hz) e 5,53 (dupeto largo, 9,3 Hz), que foram associados através do HSQC (E27 – página 47) aos carbonos em  $\delta$  25,9, 18,5 e 129,1, respectivamente. A análise detalhada dos espectros HSQC e HMBC, bem como comparação com os dados de RMN de outras substâncias aromáticas isoladas anteriormente dessa planta levaram à estrutura **5**, uma substância dimérica derivada de **1**. Foram importantes para essa proposta estrutural, as

correlações observadas no espectro HMBC (E28 – página 48) para os sinais em  $\delta$  1,90 (H-12), 3,34 (H-4), 4,36 (H-4') e 6,82 (H-5). Assim, H-12 apresentou correlações com os carbonos em  $\delta$  24,2 (H-13), 72,3 (H-3) e 75,9 (H-2), enquanto que H-4 e H-4' apresentaram correlações entre si e com os carbonos em  $\delta$  72,3 (C-3), 115,9 (C-4'a) e 129,1 (C-3'). Por outro lado, H-5 mostrou correlações com os carbonos em  $\delta$  37,0 (H-4), 142,8 (H-11) e 149,1 (H-6) (Tabela 10 – página 49, Figura 10 – página 48). A estereoquímica relativa foi deduzida pela análise das constantes de acoplamento e por experimentos de NOE. O sinal de H-3 é um duplete, com constante de acoplamento de 3,6 Hz, indicando uma relação *cis* com H-4. Por outro lado, o sinal de H-4' é um duplo-duplete, com constantes de acoplamento de 1,8 e 9,4 Hz, sendo a primeira resultante do acoplamento com H-4, indicando também uma relação *cis*. No experimento NOE, a irradiação do grupo metila em  $\delta$  1,39 (H-13) resultou no aumento da intensidade dos sinais de H-3 e H-4. Essa substância é inédita e foi denominada allagophyllina A.

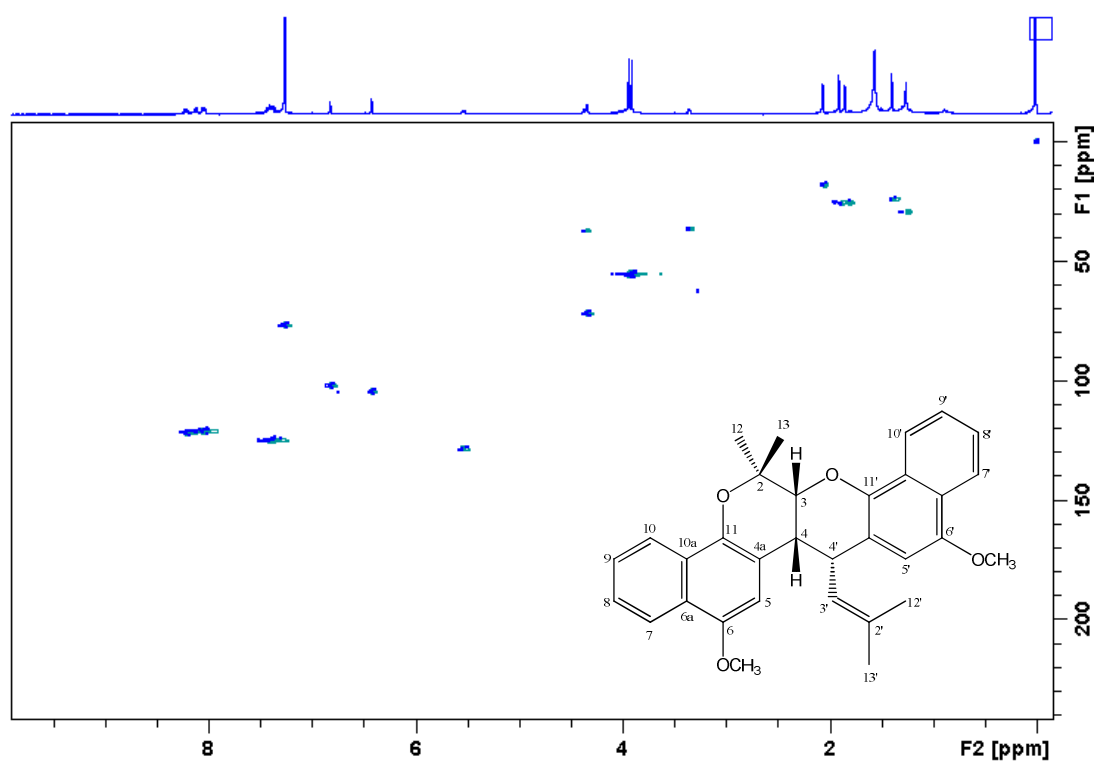
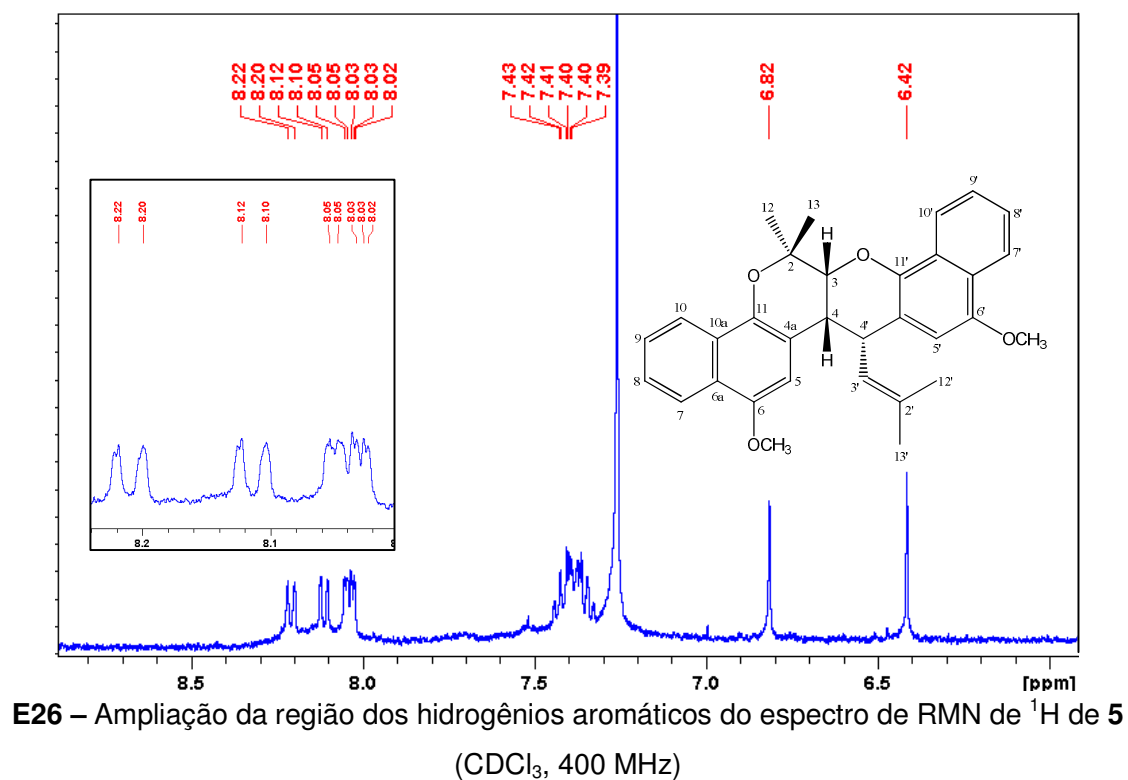




**E24** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **5** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E25** – Ampliação da região dos hidrogênios metílicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **5** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)





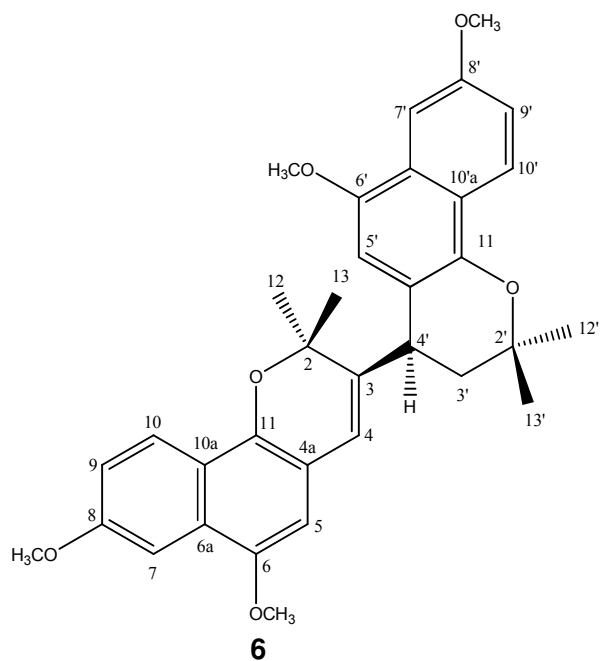
The diagram shows a chemical structure of a dimeric flavanone derivative, specifically a bisflavanone. The structure consists of two chromane-like units linked by a central carbon-carbon bond. The left unit has a benzene ring with positions 7, 8, 9, 10, and 10a, and a pyran ring with positions 4a, 5, 6, 11, and 12. A methoxy group (OCH<sub>3</sub>) is attached at position 6. The right unit has a benzene ring with positions 7', 8', 9', 10', and 11', and a pyran ring with positions 4', 5', 6', 11', and 12'. A methoxy group (OCH<sub>3</sub>) is attached at position 6'. The central carbon-carbon bond is between positions 3 and 3'. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes: position 3 has a hydrogen atom (H) on a wedge, position 4 has a hydrogen atom (H) on a dash, position 3' has a hydrogen atom (H) on a dash, and position 4' has a hydrogen atom (H) on a wedge. Curved arrows indicate electron flow or conformational changes: a large arrow from position 12 to position 13, an arrow from position 13 to position 3, an arrow from position 3 to position 4, an arrow from position 4 to position 4', an arrow from position 4' to position 3', and an arrow from position 3' to position 2'. A large curved arrow also points from the left side of the structure towards the right side.

**Figura 10** – Principais correlações observadas no Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **5**

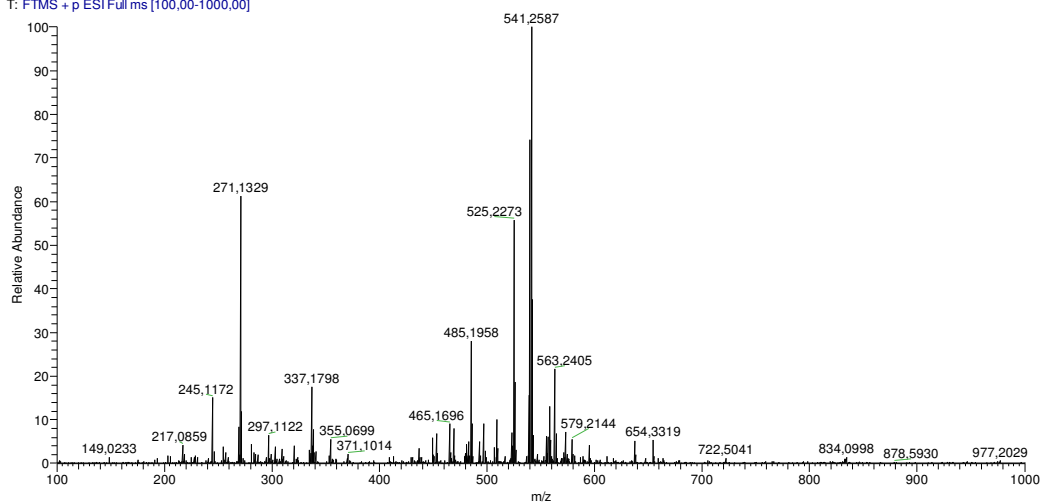
**Tabela 10** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$  de **5** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

5							
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (m, $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$	Posição	$\delta_{\text{H}}$ (m, $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$
2	-	75,9	-	3'	5,53 (dl, 9,3)	129,1	12', 13'
3	4,33 (d, 3,6)	72,3	4a, 11'	4'	4,36 ( <i>dd</i> 1,9 e 9,3)	37,7	4, 3, 4'a, 3'
4	3,35 (m)	37,0	4'a, 3', 3	4'a	-	115,9	-
4a	-	112,2	-	5'	6,42 (s)	105,1	4', 6'a, 11, 6'
5	6,82 (s)	102,4	4, 6a, 11	6'	-	149,1	-
6	-	149,1	-	6'a	-	125,4	-
6a	-	126,5	-	7'	8,05 (m)	121,3	8' ou 9', 10'a
7	8,21 (dd, 1,3 e 8,7)	122,2	10a	8'	7,41 (m)	125,7	6'a
8	7,41 (m)	125,7	10	9'	7,41 (m)	125,7	7', 10'a
9	7,41 (m)	125,7	7, 10a	10'	8,03 (m)	121,4	8'
10	8,11 (dd, 1,3 e 8,2)	121,6	8, 6a	10'a	-	126,2	-
10a	-	125,4	-	11'	-	142,2	-
11	-	142,8	-	12'	1,85 (d, 0,9)	25,9	13', 3', 2'
12	1,39 (s)	24,3	13, 3, 2	13'	2,06 (d, 1,2)	18,5	12', 3', 2'
13	1,90 (s)	25,4	12, 3, 2	H <sub>3</sub> CO-6	3,90 (s)	55,8	6
2'	-	131,6	-	H <sub>3</sub> CO-6'	3,93 (s)	56,0	6'

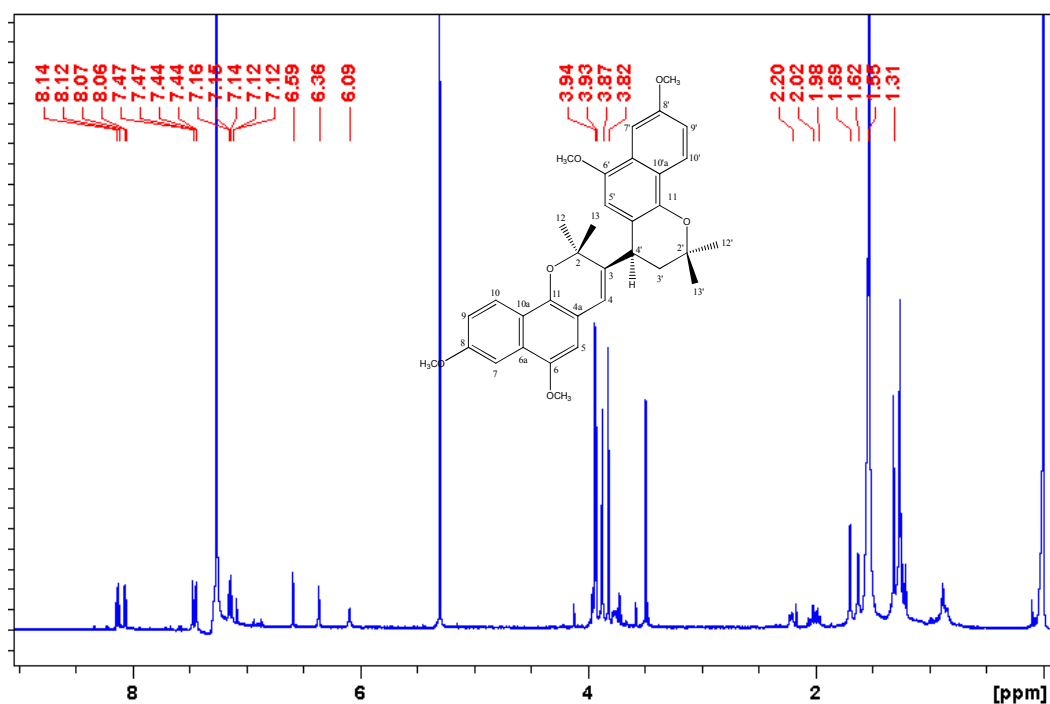
A fórmula molecular de **6** foi determinada como  $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_6$  pelo espectro de massas de alta resolução, que apresentou um pico em  $m/z$  541,2587 ( $[\text{M}+1]^+$ ) (E29 – página 50). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E30 – página 51) apontou para uma estrutura dimérica, pois apresentou sinais para quatro grupos metila ( $\delta$  1,31, 1,55, 1,62 e 1,70), quatro grupos metoxila ( $\delta$  3,82, 3,87, 3,93 e 3,94) e nove hidrogênios aromáticos, sendo três deles isolados ( $\delta$  6,10, 6,36 e 6,59) (E31 – página 51). A análise dos espectros HSQC (E32 – página 52) e HMBC (E33 – página 52, Figura 11 – página 53) levou à estrutura **6**, que é um dímero de **2**. Algumas das correlações mais importantes para a determinação da junção entre as duas unidades foram observadas para os sinais em  $\delta$  1,31 (H-12') e 3,76 (H-4'). O primeiro apresentou correlações com os carbonos em  $\delta$  29,9 (C-13'), 43,9 (C-3') e 74,4 (C-2'), enquanto que o segundo mostrou correlações com os carbonos em  $\delta$  79,4 (C-2), 113,9 (C-4'a) e 122,1 (C-4) (Tabela 11 – página 53). A estereoquímica relativa foi determinada por experimentos de NOE. Irradiação do sinal de H-4' ( $\delta$  3,76, m) causou aumento na intensidade dos sinais de H-12 ( $\delta$  1,70) e H-12' ( $\delta$  1,31). Esta substância também é inédita e foi denominada allagophyllina B.



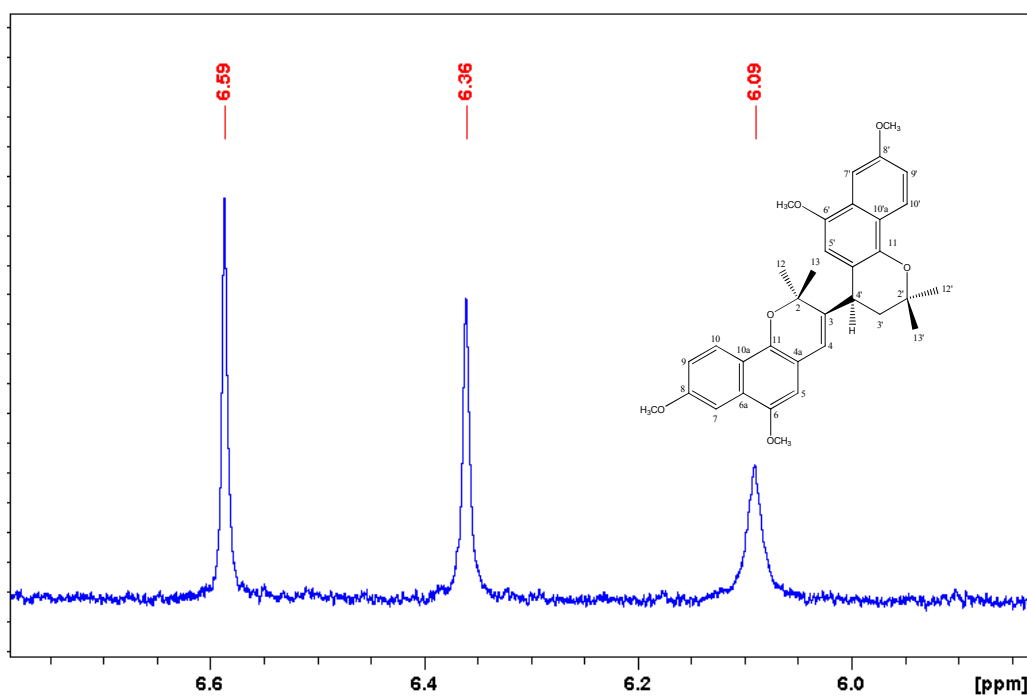
8 #56 RT: 0,34 AV: 1 NL: 2,09E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [100,00-1000,00]



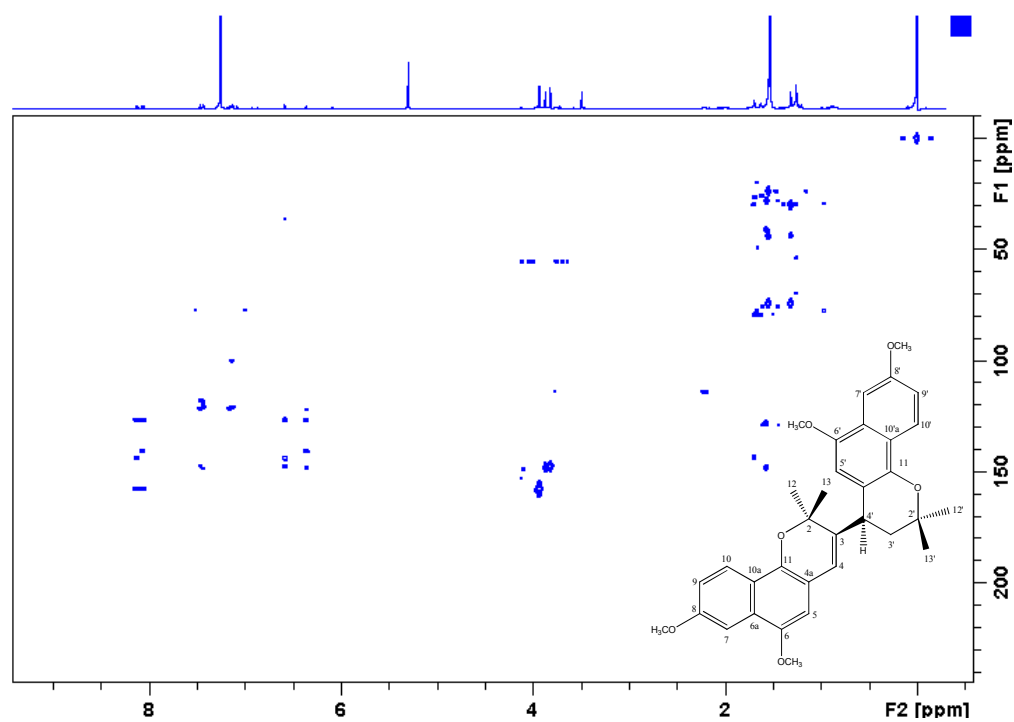
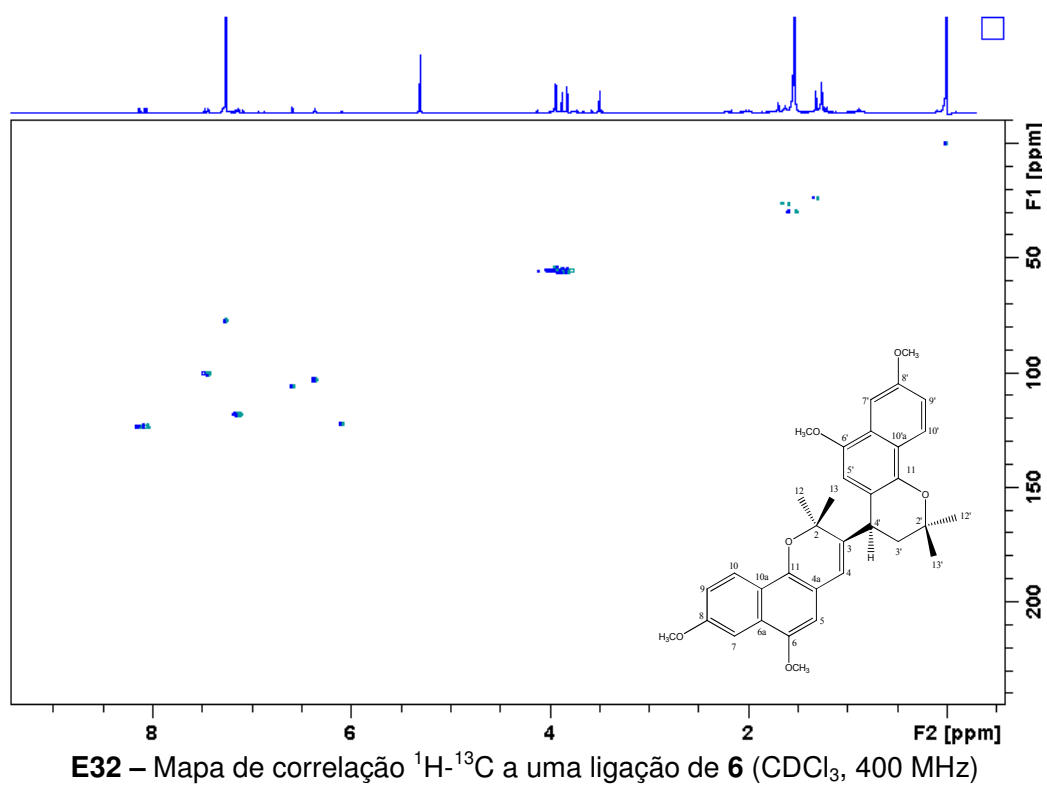
**E29 – Espectro de massas de alta resolução da substância 6**

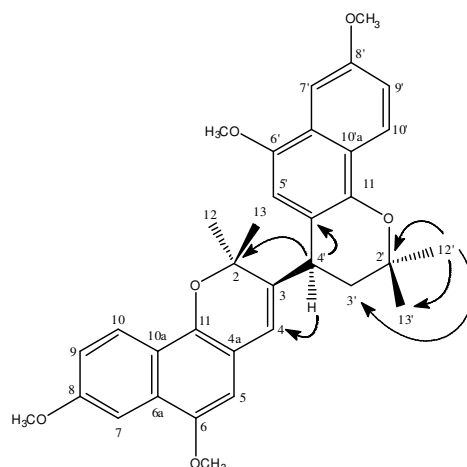


**E30** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **6** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)



**E31** – Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos e olefínicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **6** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)





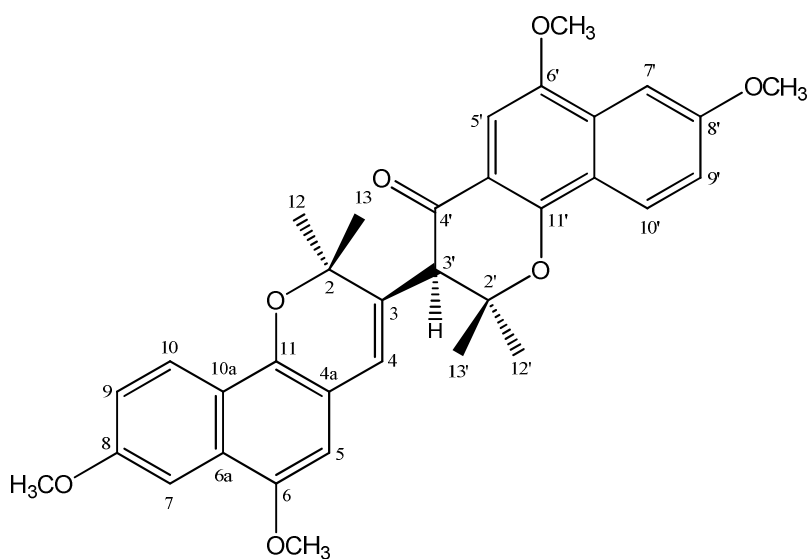
**Figura 11** – Principais correlações observadas no Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **6**

**Tabela 11** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$  de **6** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 e 600 MHz)

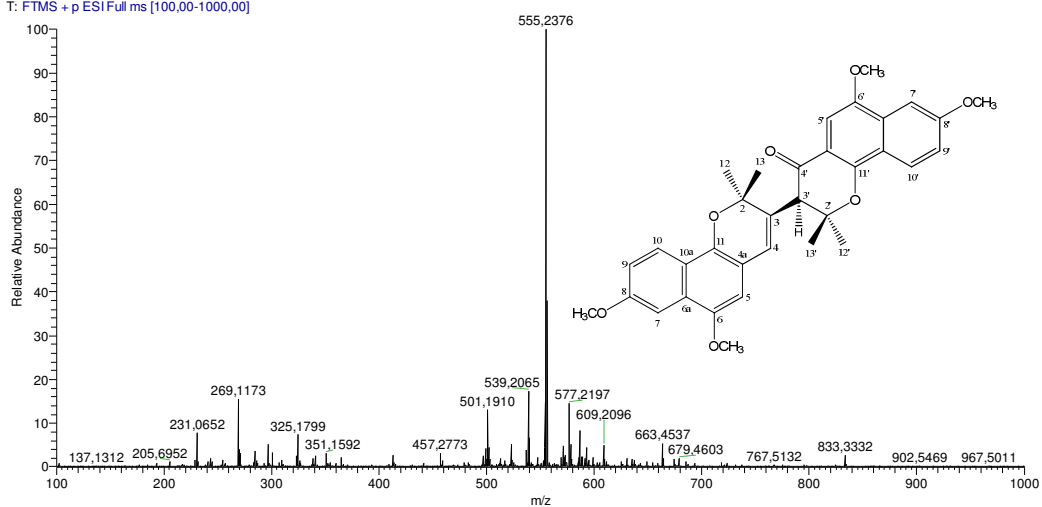
6							
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (m, $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$	Posição	$\delta_{\text{H}}$ (m, $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$
2	-	79,4	-	4'	3,76 (m)	36,0	2, 4'a, 4'
3	-	143,5	-	4'a	-	113,9	-
4	6,10 (s)	122,1	2	5'	6,59 (s)	106,0	4', 4'a, 6'a, 11
4a	-	N.O.	-	6'	-	147,6	-
5	6,36 (s)	103,0	4, 6a, 11, 6	6'a	-	126,6	-
6	-	148,3	-	7'	7,47 (d, 2,6)	100,2	9', 10'a, 6', 8'
6a	-	126,8	-	8'	-	157,8	-
7	7,44 (d, 2,4)	100,3	9, 10a, 6, 8	9'	7,15 (dd, 2,6 e 9,2)	117,9	7', 10'a
8	-	157,7	-	10'	8,13 (d, 9,2)	123,5	6'a, 11, 8'
9	7,13 (dd, 2,4 e 9,1)	118,2	7, 10a	10'a	-	121,6	-
10	8,07 (d, 9,1)	123,2	6a, 11, 8	11'	-	143,8	-
10a	-	120,9	-	12'	1,31 (s)	23,7	13', 3', 2'
11	-	140,8	-	13'	1,55 (s)	29,9	12', 3', 2'
12	1,70 (s)	26,0	13, 2, 3	H <sub>3</sub> CO-6	3,82 (s)	55,7	6
13	1,62 (s)	26,6	12, 2, 3	H <sub>3</sub> CO-6'	3,87 (s)	55,6	6'
2'	-	74,4	-	H <sub>3</sub> CO-8	3,93 (s)	55,2	8
3'	2,00 e 2,20 (m)	43,9	2', 4'a	H <sub>3</sub> CO-8'	3,94 (s)	55,2	8'

N.O. = não observado

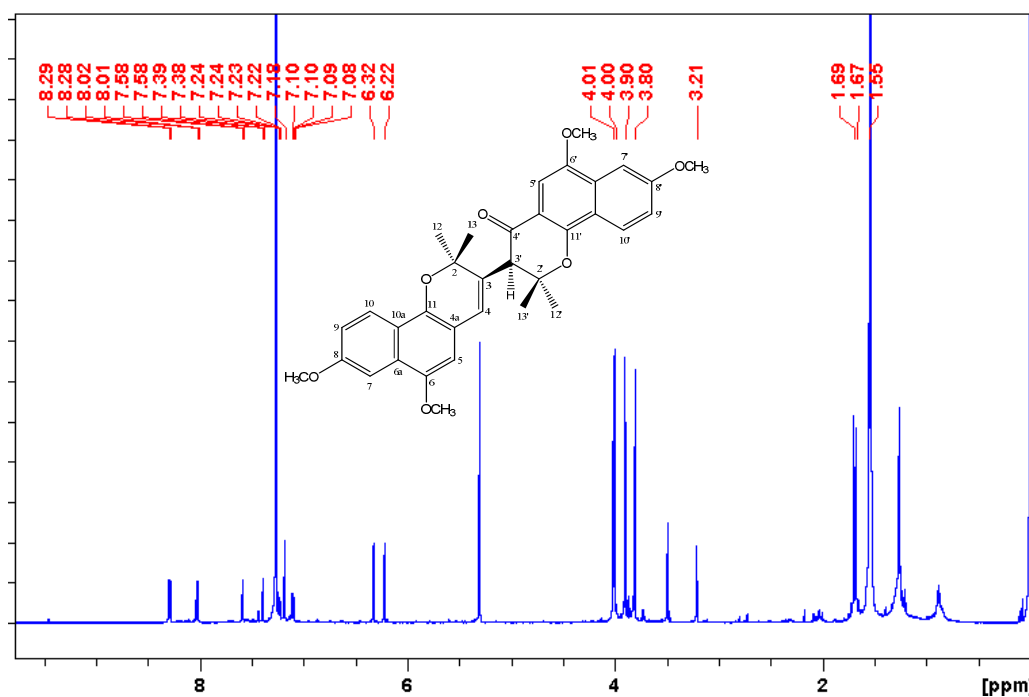
A substância **7** teve a fórmula molecular  $C_{34}H_{34}O_7$ , determinada pelo espectro de massas de alta resolução que mostrou um pico em  $m/z$  555,2376 ( $[M+1]^+$ ) (E34 – página 55). O seu espectro de RMN de  $^1H$  (E35 – página 55) foi muito similar ao de **6**, apresentando como principal diferença os deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos (E36 – página 56) e, a substituição do multipeto em  $\delta$  3,76 (H-4') por um simpleto em  $\delta$  3,21 (H-3') (E37 – página 56). Este hidrogênio apresentou no espectro HMBC (E39 – página 57, Tabela 12 – página 58, Figura 12 – página 58) correlação com um carbono em  $\delta$  191,4, indicando a presença de um grupo carbonila de cetona, e também com os carbonos em  $\delta$  79,5 (C-2), 122,8 (C-4), e 132,9 (C-3). A estereoquímica relativa foi determinada por experimentos de NOE. A irradiação do sinal de H-3' ( $\delta$  3,20, s) causou aumento na intensidade dos sinais de H-12' ( $\delta$  1,69, s) e H-12 ( $\delta$  1,68, s) enquanto que a irradiação do sinal de H-4 ( $\delta$  6,32, s) causou aumento na intensidade dos sinais de H-5 ( $\delta$  6,22, s) e H-12' ( $\delta$  1,69, s). Análise detalhada das demais correlações observadas nos espectros HSQC (E38, página 57) e HMBC permitiram propor a estrutura **7**, que também é um dímero de **2**, inédito na literatura e, foi denominada allagophyllina C.



10 #103 RT: 0,58 AV: 1 NL: 8,63E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [100,00-1000,00]

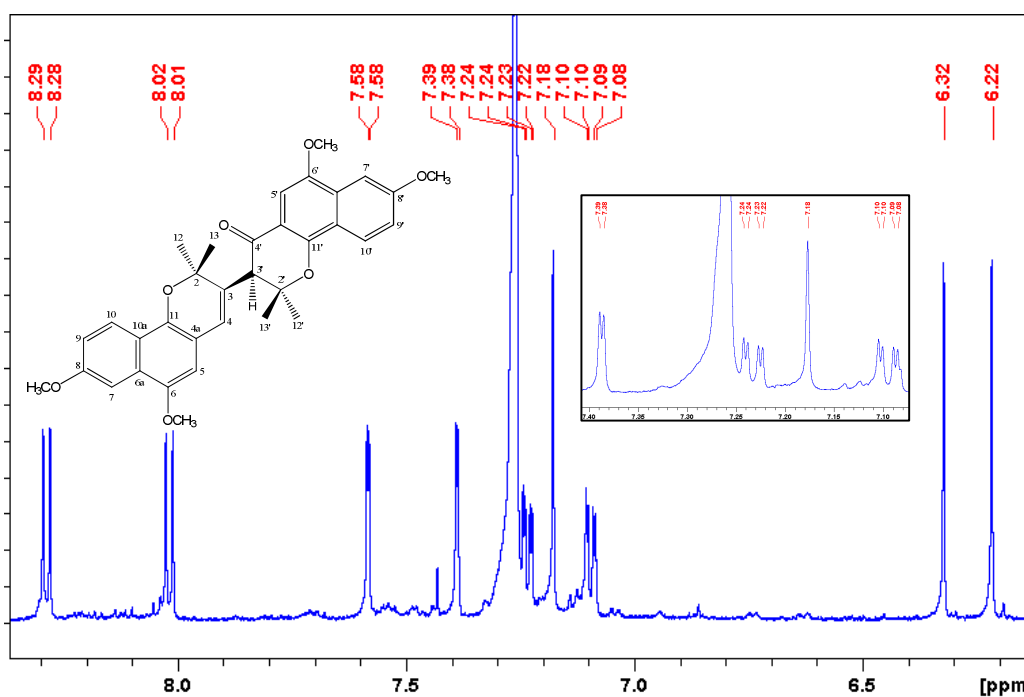


**E34** – Espectro de massas de alta resolução da substância **7**

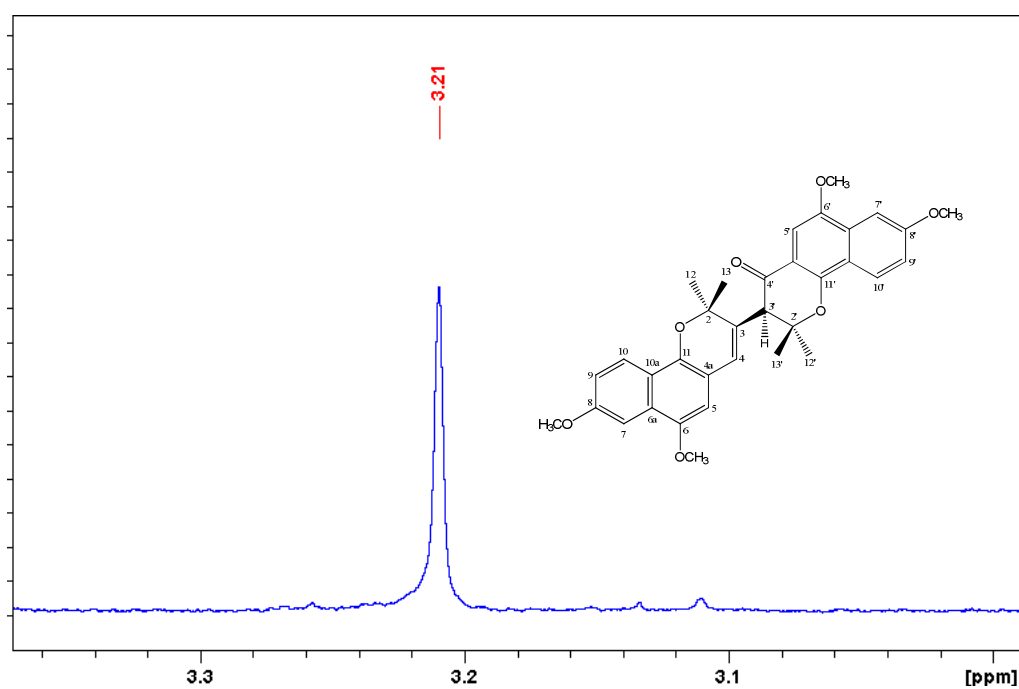


**E35** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **7** (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)

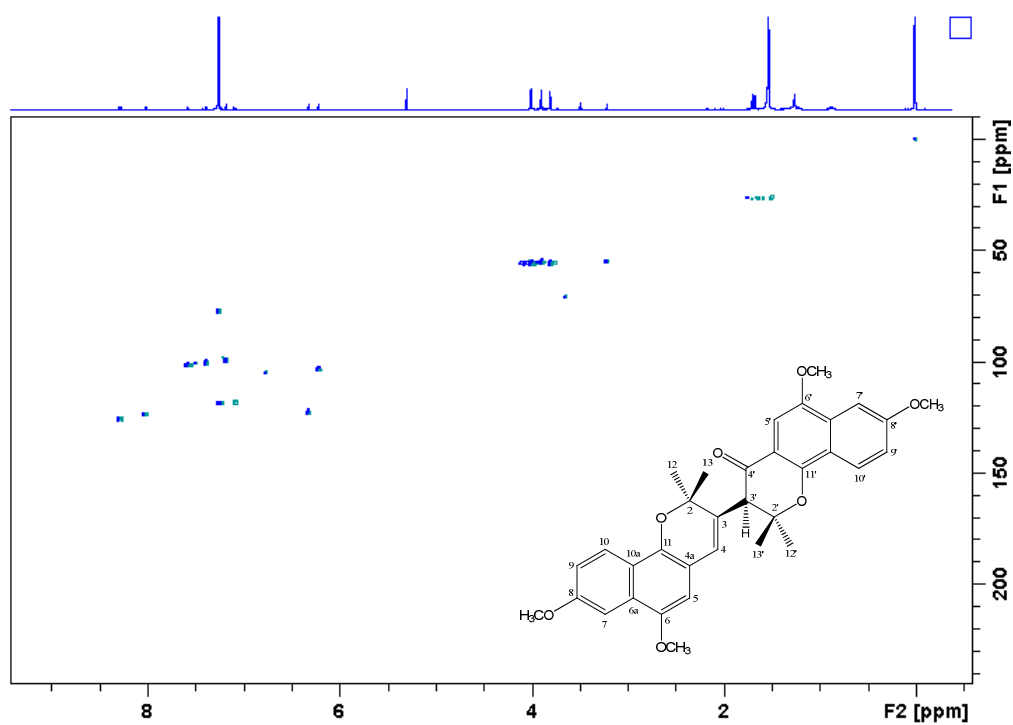




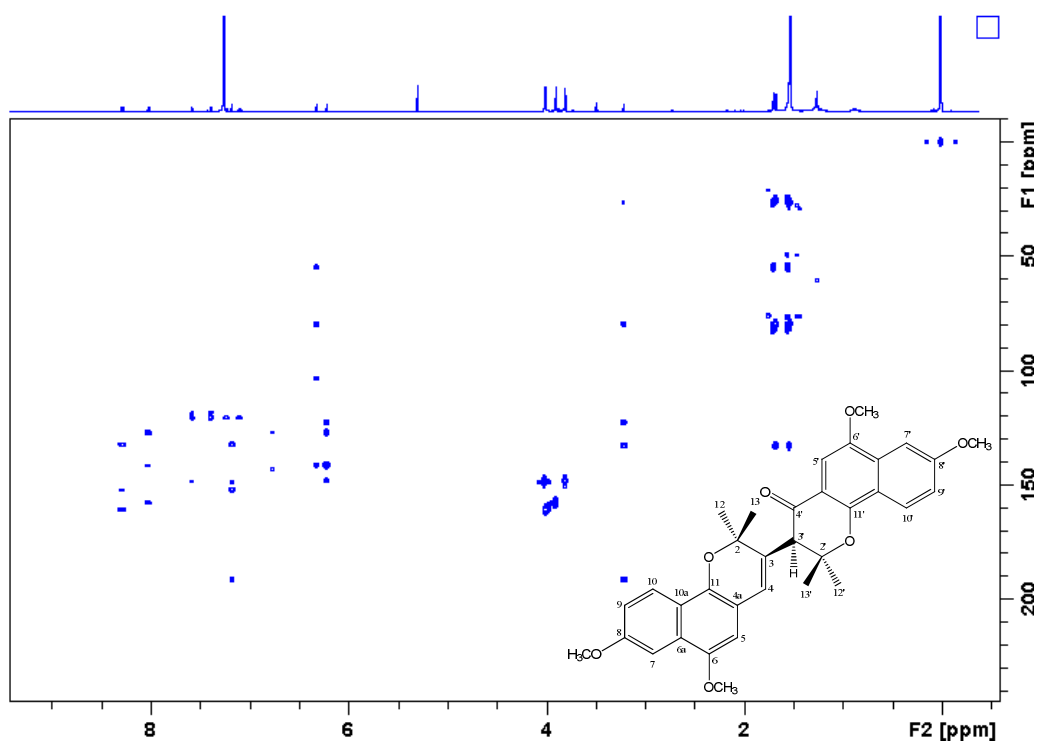
**E36** – Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos e olefínicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **7** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



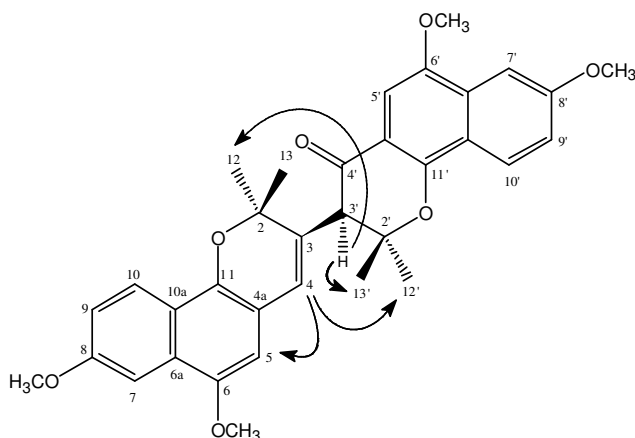
**E37** – Ampliação da região do hidrogênio metínico do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **7** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)



E38 – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação de 7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



E39 – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de 7 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



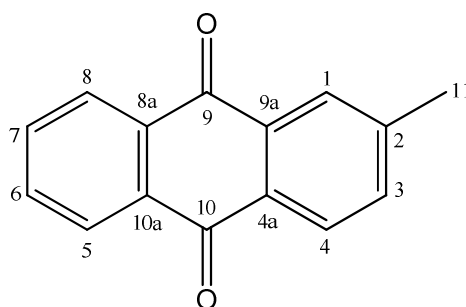
**Figura 12** – Principais correlações observadas no Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **7**

**Tabela 12** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{LD}J_{\text{H,C}}$  de **7** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 e 600 MHz)

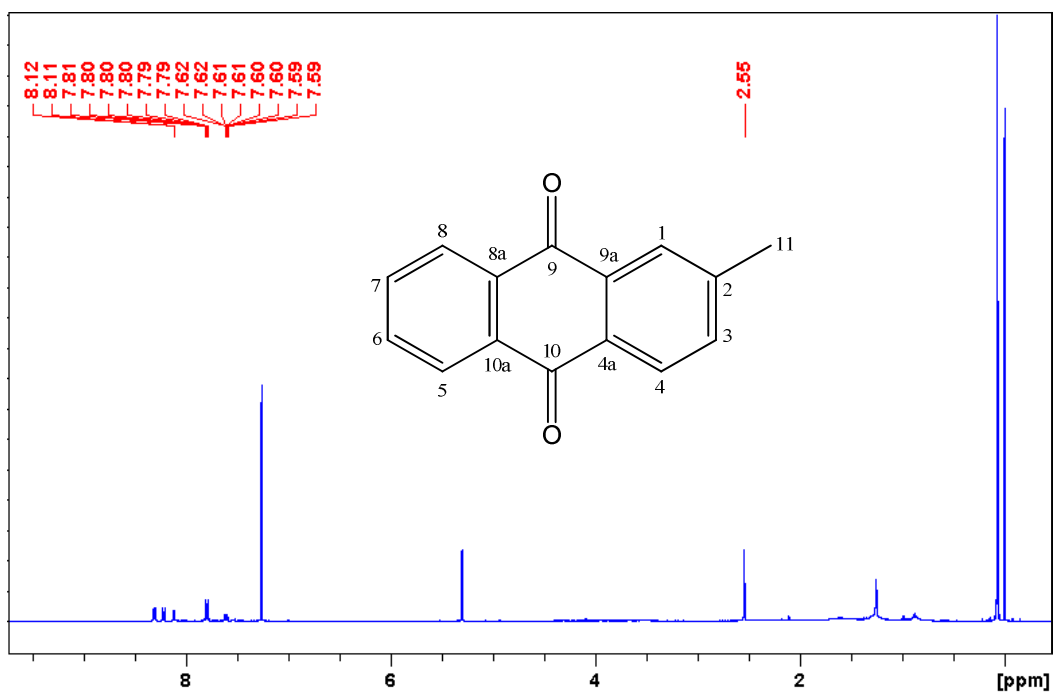
7							
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (m, $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$	Posição	$\delta_{\text{H}}$ (m, $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$
2	-	79,5	-	4'	-	191,4	-
3	-	132,9	-	4'a	-	111,0	-
4	6,32 (s)	122,8	3', 2, 5, 11	5'	7,18 (s)	99,3	6'a, 6', 11', 4'
4a	-	100,6	-	6'	-	148,6	-
5	6,22 (s)	103,6	4, 6a, 11, 6	6'a	-	132,3	-
6	-	148,3	-	7'	7,58 (d, 2,5)	100,6	9', 10'a, 6', 8'
6a	-	127,1	-	8'	-	160,9	-
7	7,38 (d, 2,5)	101,6	9, 10a, 6, 8	9'	7,10 (dd, 2,5 e 9,0)	118,8	7', 10'a
8	-	157,9	-	10'	8,29 (d, 9,0)	125,7	6'a, 11, 8'
9	7,24 (dd, 2,5 e 9,0)	118,4	7, 10a	10'a	-	120,7	-
10	8,02 (d, 9,0)	123,5	6a, 11, 8	11'	-	152,0	-
10a	-	120,7	-	12'	1,69 (s)	25,8	13', 3', 2'
11	-	141,4	-	13'	1,55 (s)	26,4	12', 3', 2'
12	1,68 (s)	26,2	13, 2, 3	H <sub>3</sub> CO-6	3,80(s)	55,9	6
13	1,53 (s)	25,3	12, 2, 3	H <sub>3</sub> CO-6'	4,01 (s)	55,7	6'
2'	-	81,8	-	H <sub>3</sub> CO-8	3,90 (s)	55,3	8
3'	3,21 (s)	54,9	2, 4'a, 4, 3, 4'	H <sub>3</sub> CO-8'	4,00 (s)	55,7	8'

### 3.2.3. Identificação de **8** - Antraquinona

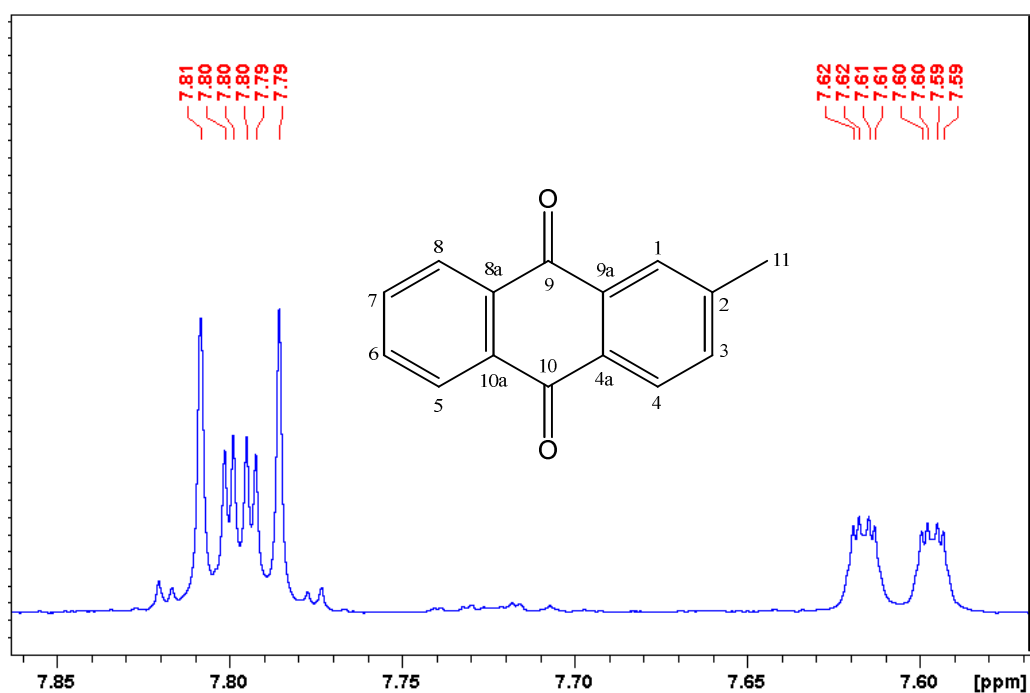
A substância **8** foi isolada como um sólido amarelo, cujo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E40 – página 60) apresentou sinais de sete hidrogênios aromáticos. Destes, três sinais pertenciam a um sistema de spin com multiplicidades típicas de um anel aromático 1,2,4-trissubstituído ( $\delta$  8,12; 7,61 e 8,22), enquanto dois formavam um multiplete ( $\delta$  8,31) e, os dois restantes se apresentavam como um duplo duplete ( $\delta$  7,80) (E41-42 – páginas 60-61). Um simpleto em  $\delta$  2,54 foi atribuído a uma metila ligada a anel aromático. Os espectros de HSQC (E43 – página 61) e HMBC (E44 – página 62, Tabela 13 – página 62, Figura 13 – página 63) mostraram correlações de 12 carbonos aromáticos, de um grupo metila e de dois grupos carbonila, caracterizando um núcleo antraquinônico. A partir destes dados, **8** foi identificado como 2-metilantraquinona, também conhecido como tectoquinona (MOREIRA *et al.*, 2006).



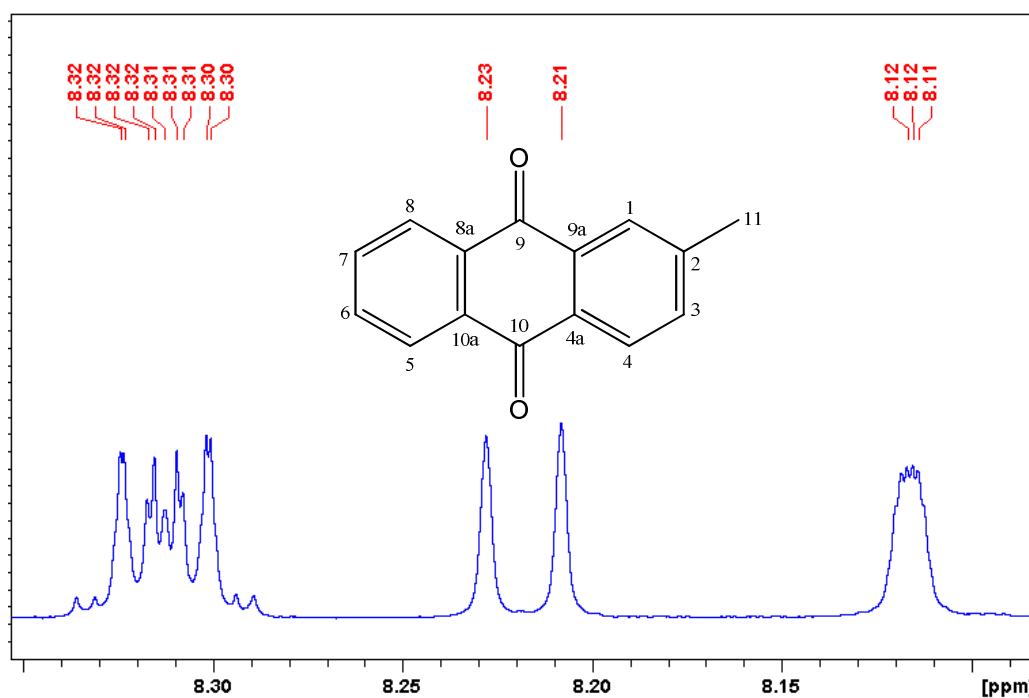
**8**



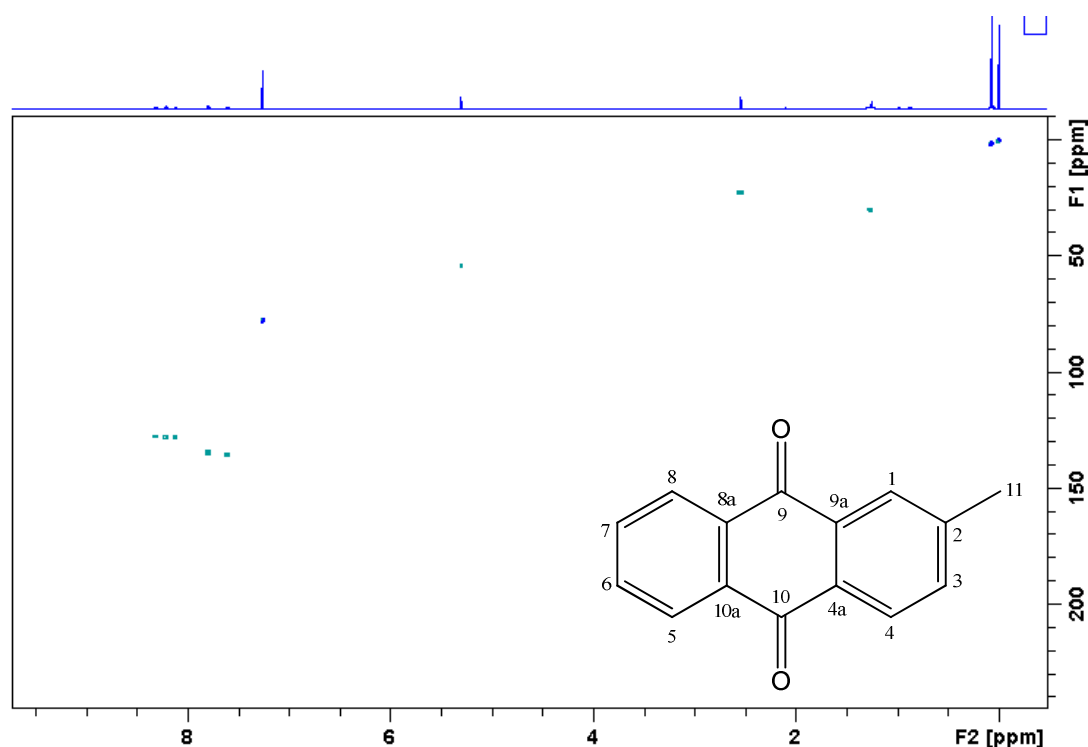
**E40** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **8** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



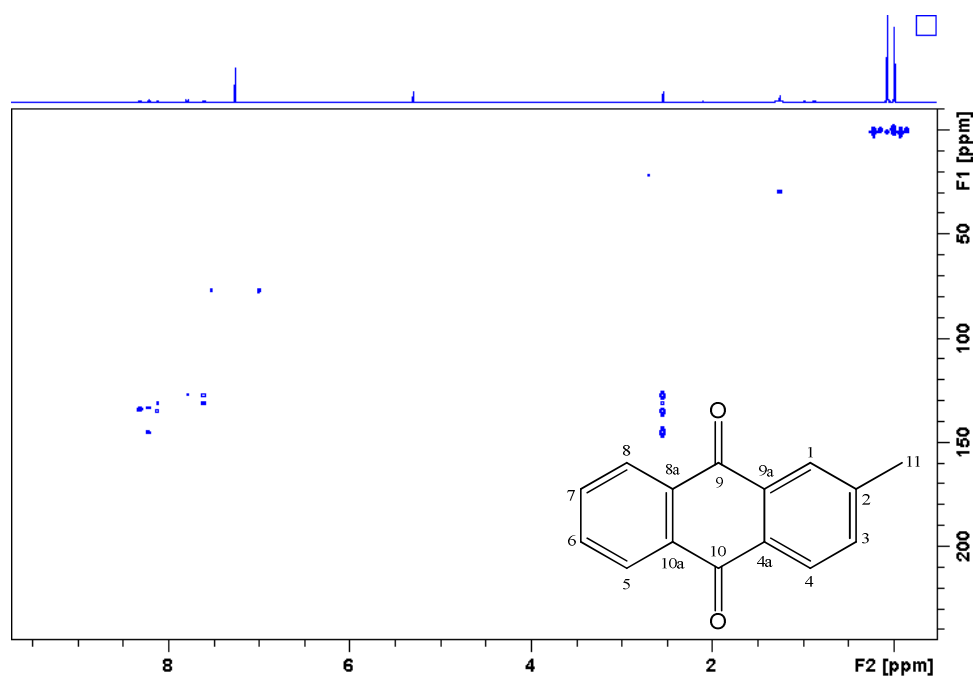
**E41** – Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **8** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E42** – Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **8** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



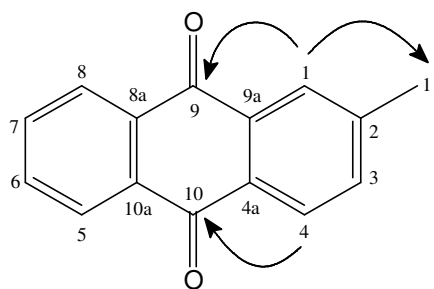
**E43** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação de **8** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E44** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **8** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

**Tabela 13** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$  de **8** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

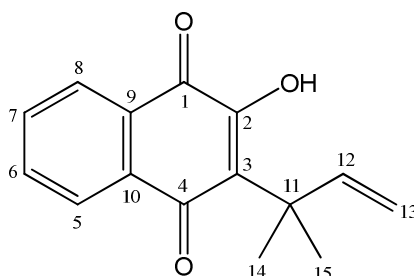
Posição	<b>8</b>		
	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$
1	8,12 ( <i>dq</i> , 0,6; 1,9)	127,5	3, 4a, 9, 11
2	-	145,3	-
3	7,61 ( <i>ddq</i> , 0,7; 1,9; 8,0)	134,9	1, 4, 4a, 11
4	8,22 ( <i>d</i> , 8,0)	127,6	2, 9a, 10
4a	-	131,2	-
5	8,31 ( <i>m</i> )	127,2	6, 7
6	7,80 ( <i>dd</i> , 5,6; 3,3)	134,0	5, 7, 8
7	7,80 ( <i>dd</i> , 5,6; 3,3)	134,0	5, 6, 8
8	8,31 ( <i>m</i> )	127,2	6, 7
8a	-	133,6	-
9	-	183,6	-
9a	-	133,3	-
10	-	183,0	-
10a	-	133,6	-
11	2,54 ( <i>s</i> )	21,9	1, 2, 3



**Figura 13** – Principais correlações observadas no Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **8**

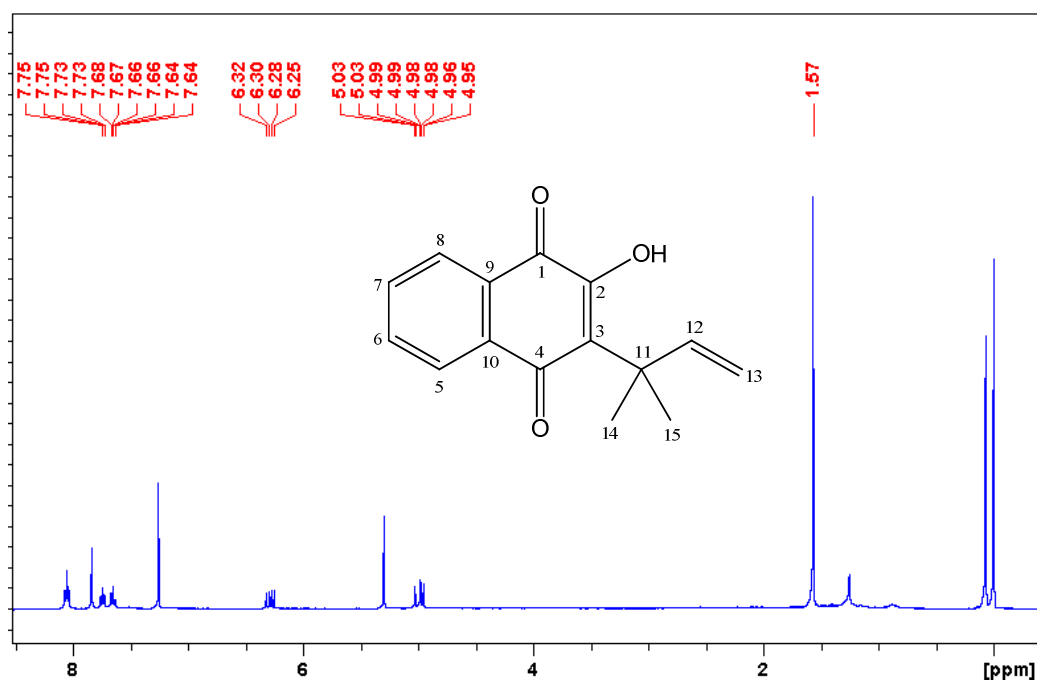
### 3.2.4. Identificação de **9**, **10**, **11** e **12** e determinação estrutural de **13**, **14** e **15** – Naftoquinonas e hidronaftoquinonas

A substância **9**, um sólido vermelho, mostrou em seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E45 – página 64) sinais para quatro hidrogênios em  $\delta$  8,06 (*ddd*, 0,5; 1,4; 7,60); 8,05 (*ddd*, 0,5; 1,3; 7,60), 7,74 (*ddd*, 1,3; 7,6; 7,6) e 7,65 (*ddd*, 1,4; 7,6; 7,6), indicando um anel aromático 1,2-dissubstituído (E46 – página 64). Também foram observados sinais de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  6,29 (*dd*, 10,6; 17,4 Hz), 5,01 (*dd*, 10,0; 17,4 Hz) e 4,96 (*dd*, 10,0; 10,6 Hz) e, de duas metilas equivalentes em  $\delta$  1,57 (*s*), caracterizando a presença de um grupo 1,1-dimetilalila (E47 – página 65). Finalmente, foi observado um simpleto em  $\delta$  7,84, que não mostrou correlação com nenhum carbono no espectro HSQC (E48 – página 65), sugerindo um grupo hidroxila (E46 – página 64). O espectro HMBC (E49 página 66, Tabela 14 – página 67, Figura 14 – página 66) mostrou a presença de dois grupos carbonila em  $\delta$  182,2 e 184,7, típico de quinonas. A combinação destes dados e das demais correlações a uma ligação e a longa distância permitiu identificar **9** como 2-hidroxi-3-(1,1-dimetilalil)-naftoquinona, conhecido como dunniol (KHAMBAY *et al.*, 1999).

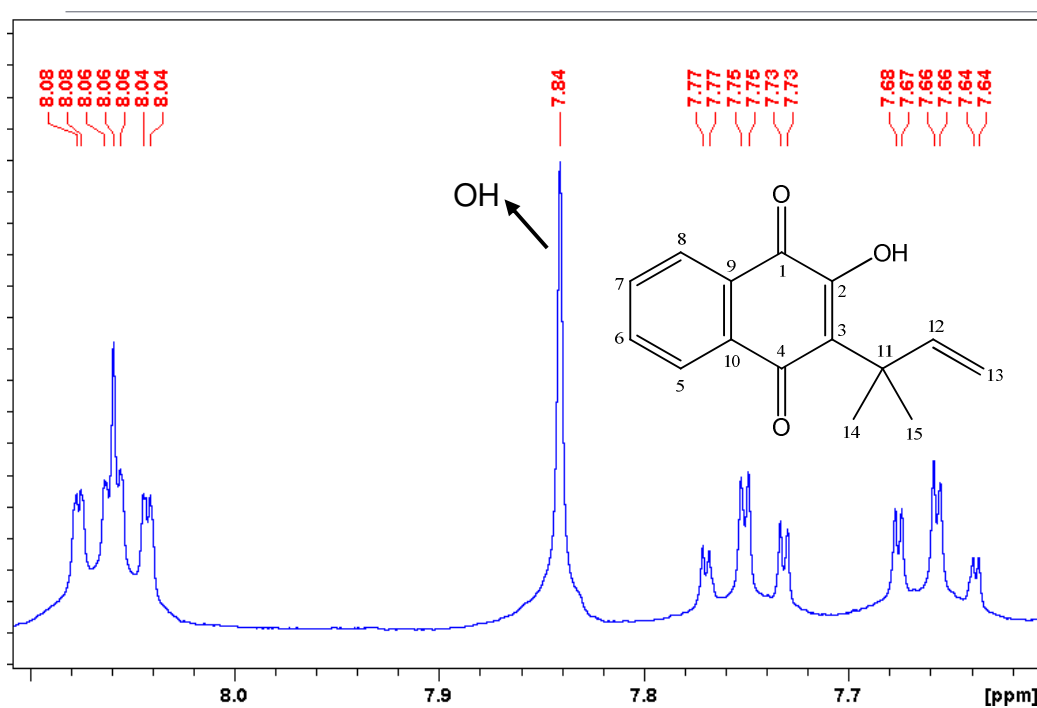


**9**

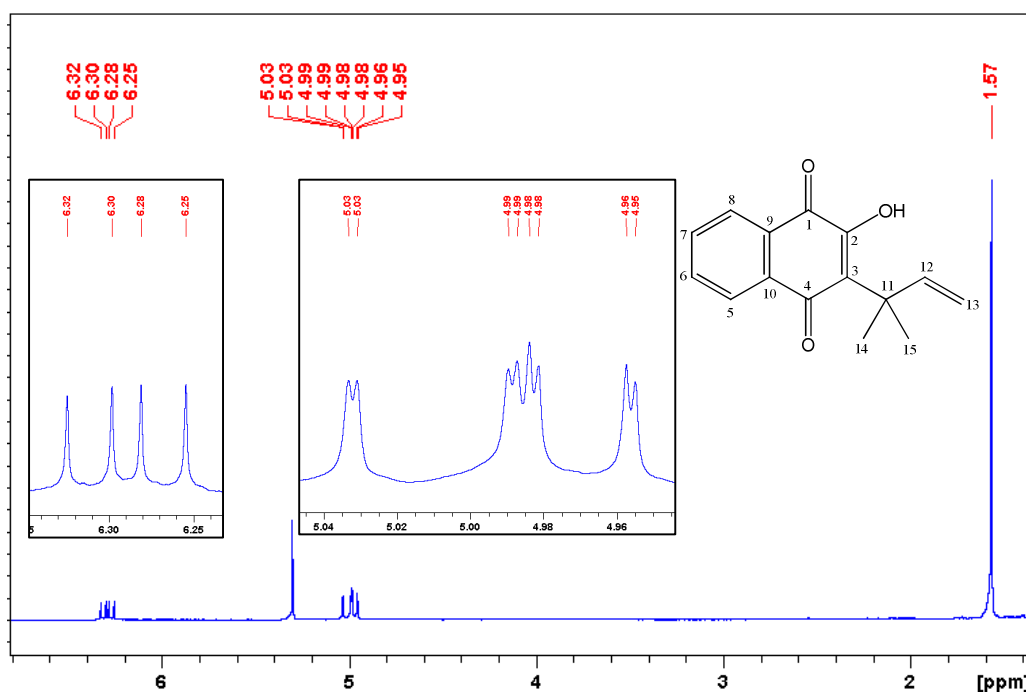




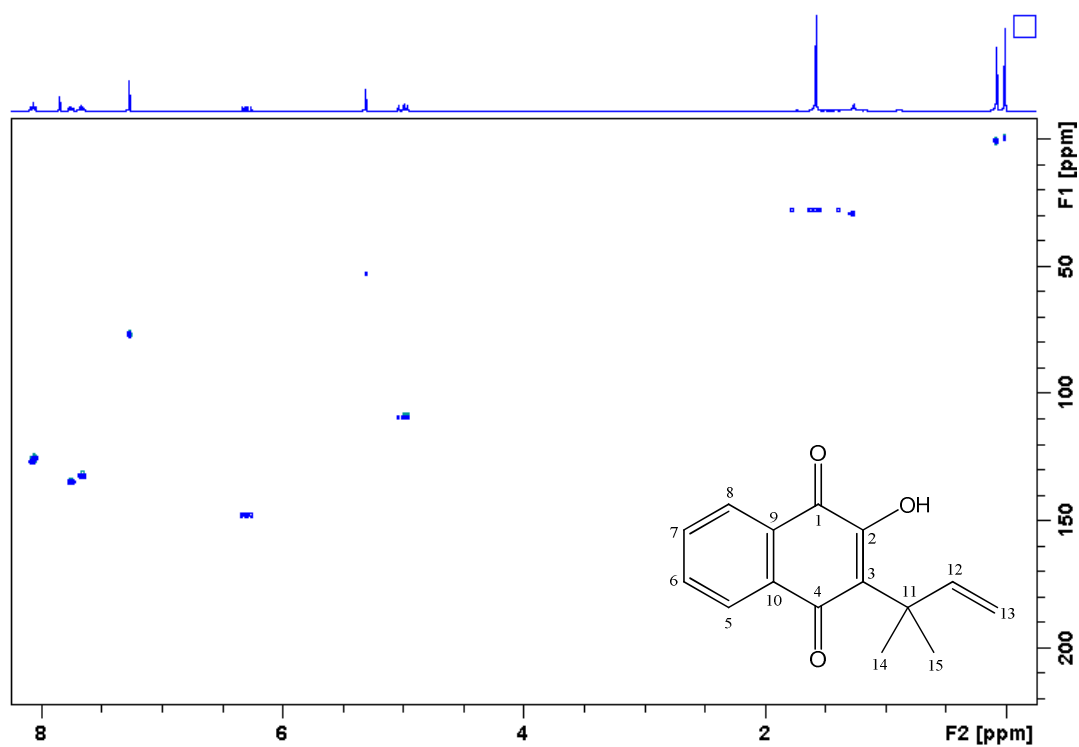
**E45** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **9** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



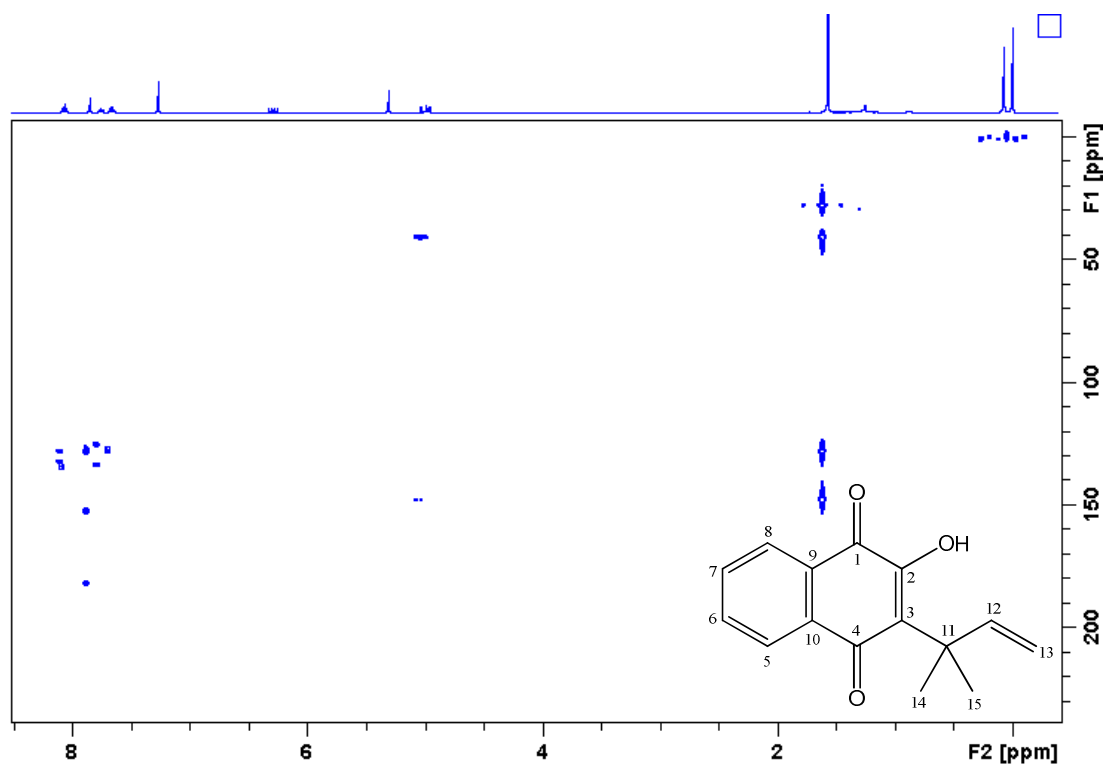
**E46** – Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos e do grupo hidroxila do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **9** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



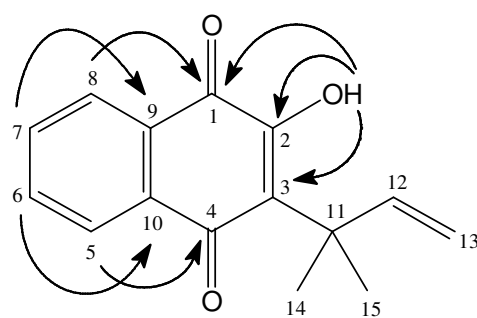
**E47** – Ampliação da região dos hidrogênios do grupo 1,1-dimetilalila do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **9** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E48** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação de **9** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E49** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **9** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

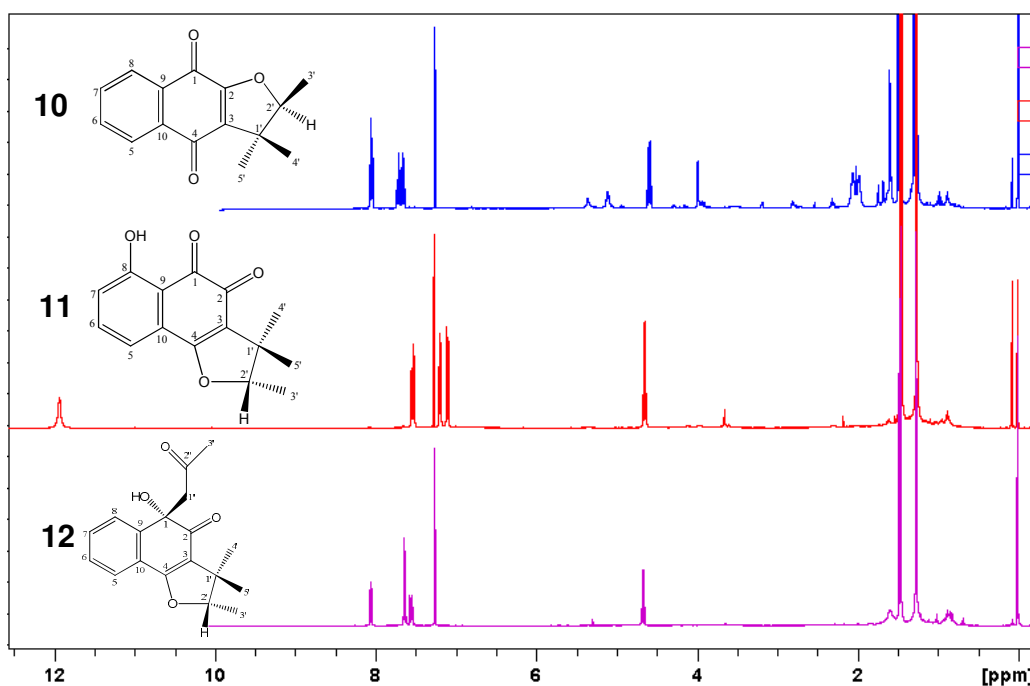


**Figura 14** – Principais correlações observadas no Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **9**

**Tabela 14** – Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$  de **9** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

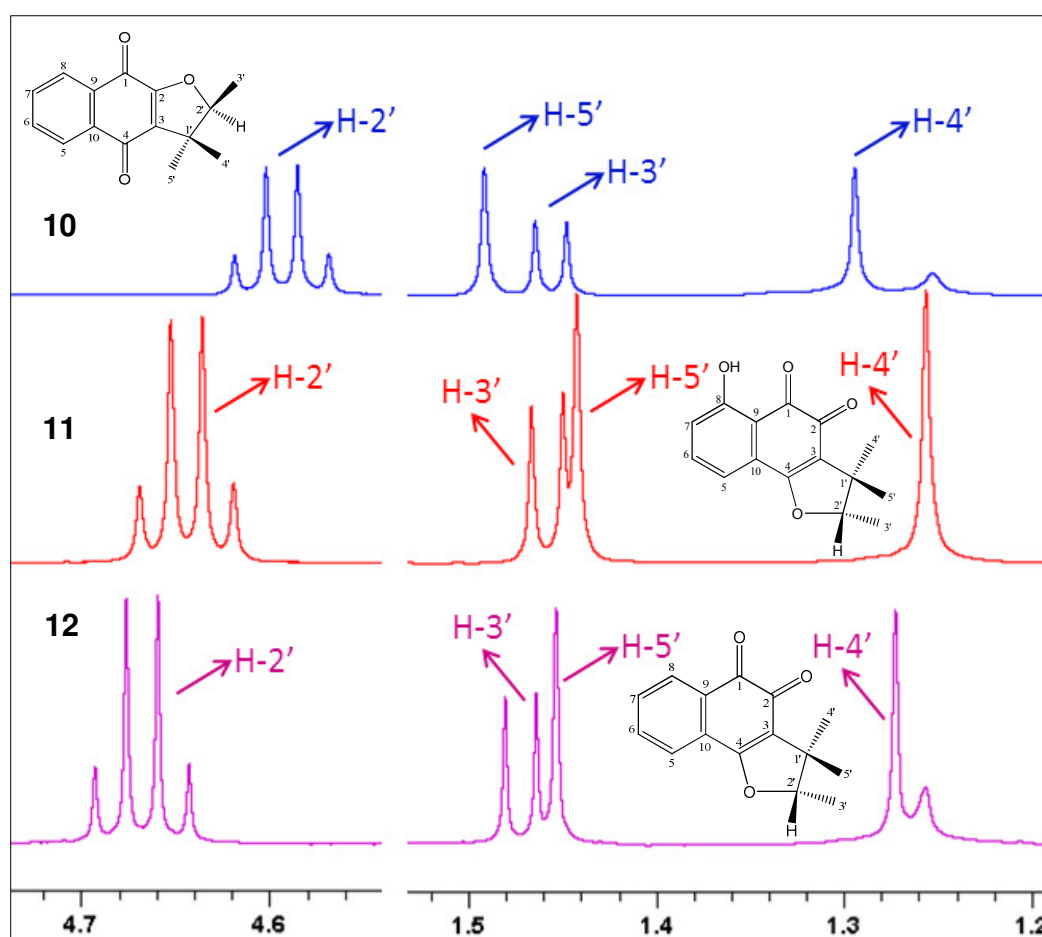
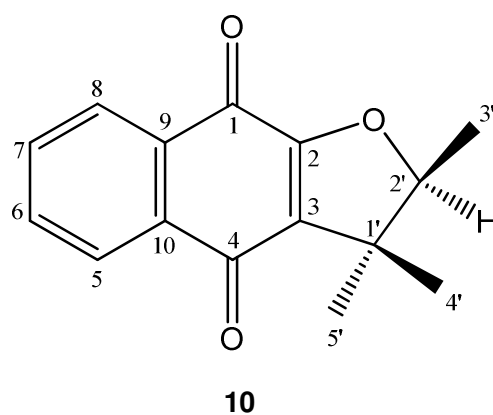
Posição	<b>9</b>		
	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$
1	-	182,2	-
2	-	152,9	-
3	-	128,3	-
4	-	184,7	-
5	8,06 ( <i>ddd</i> , 7,2; 5,6; 1,1)	126,8	4, 7, 9, 10
6	7,74 ( <i>ddd</i> , 8,8; 7,5; 1,2)	135,0	8, 10
7	7,65 ( <i>ddd</i> , 8,8; 7,5; 1,3)	132,4	5, 9
8	8,05 ( <i>ddd</i> , 7,2; 5,8; 1,1)	125,6	1, 6, 9, 10
9	-	128,4	-
10	-	134,2	-
11	-	41,0	-
12	6,29 ( <i>dd</i> , 17,4; 10,6)	147,9	3, 11, 14, 15
13	4,96 ( <i>dd</i> , 4,4; 1,0)	109,4	11, 12
	5,01 ( <i>dd</i> , 11,3; 1,0)		
14	1,57 ( <i>s</i> )	27,9	3, 11, 12, 15
15	1,57 ( <i>s</i> )	27,9	3, 11, 12, 14
OH	7,84 ( <i>s</i> )	-	1, 2, 3, 4

As substâncias **10**, **11** e **12** foram isoladas como sólidos, de cor amarela (**10**), vermelha (**11**) e laranja (**12**). Os seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (E50 – página 68) foram similares entre si, apresentando sinais de hidrogênios ligados a anéis aromáticos e, de um grupo 2,3-diidro-2,3,3-trimetilfurano, caracterizado pela presença de um quarteto em  $\delta$  4,5 (1H,  $J = 6,7$  Hz), um duplete em  $\delta$  1,4 (3H, *d*,  $J = 6,7$  Hz) e, dois simpletos em  $\delta$  1,49 e 1,29 (3H cada um) (E51 – página 69). Esses dados sugeriram que essas três substâncias eram naftoquinonas estruturalmente semelhantes.

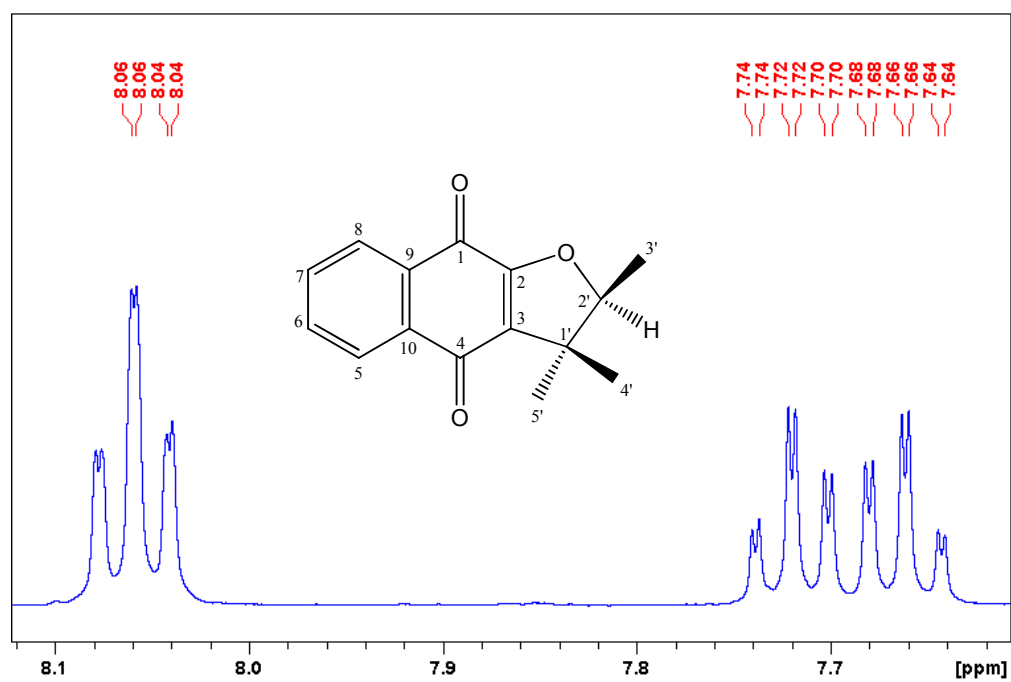
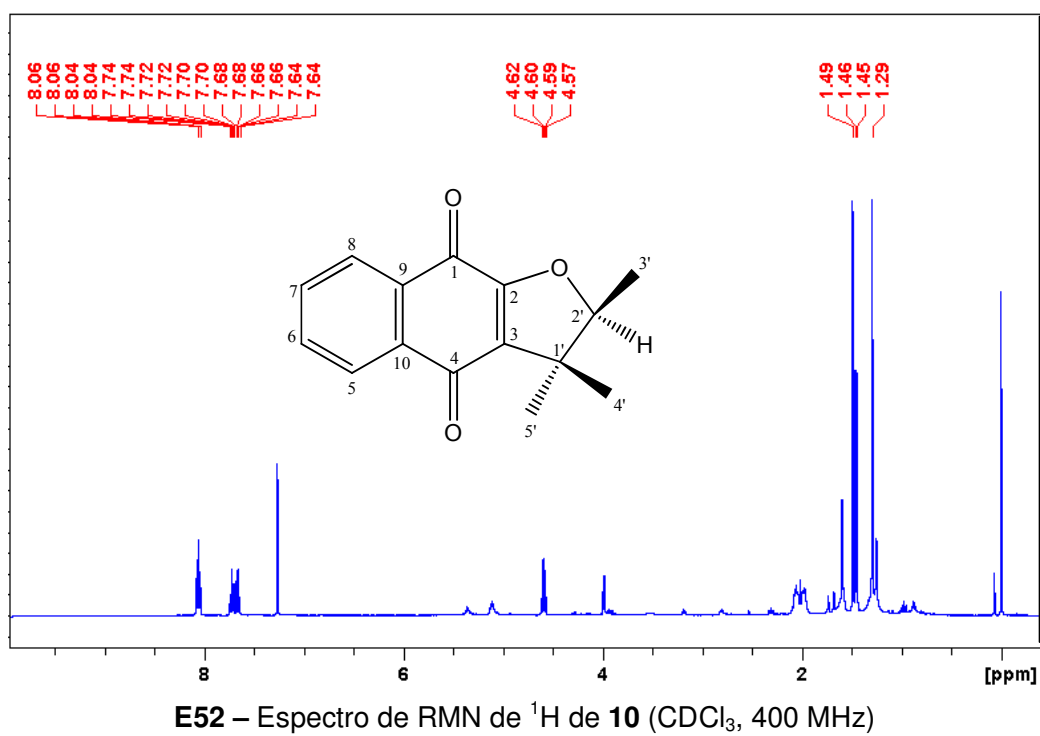


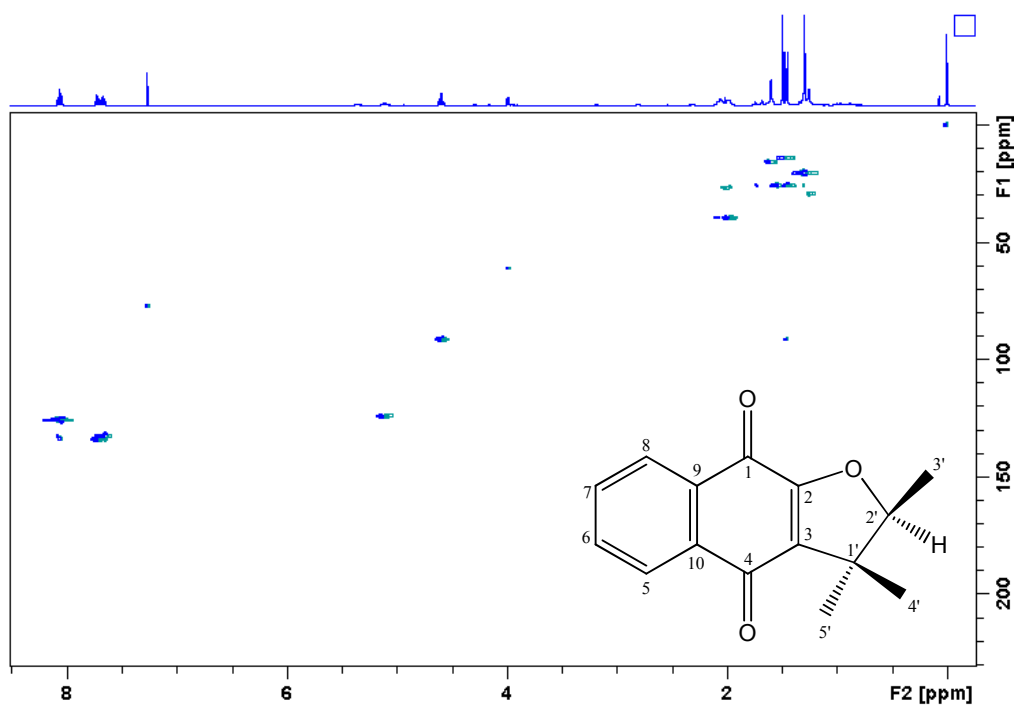
**E50** – Comparação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de **10**, **11** e **12** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E52 – página 70) de **10** foram também observados sinais de quatro hidrogênios ( $\delta$  8,07 e  $\delta$  8,5, *dd*, 7,5 e 1,5 Hz;  $\delta$  7,72 e 7,66, *ddd*, 7,6, 7,5 e 1,5 Hz) (E53 – página 70), formando um conjunto de spin, com multiplicidades e constantes de acoplamento típicos de um anel aromático 1,2-disubstituído. No experimento HMBC (E55 – página 71) os sinais em  $\delta$  8,05 e 8,07 mostraram correlação com os carbonos em  $\delta$  181,8 e 178,3, respectivamente, confirmando a estrutura de uma 1,4-naftoquinona. O grupo 2,3-diidro-2,3,3-trimetilfurano também foi confirmado pelas correlações dos experimentos HSQC (E54 – página 71) e HMBC (Tabela 15 – página 80, Figura 15 – página 72). Assim foi possível observar que os hidrogênios do grupo metila em  $\delta$  1,45 estavam ligados ao carbono em  $\delta$  14,3 e, mostravam correlações com os carbonos em  $\delta$  45,2 e 91,7. Por outro lado, os grupos metila em  $\delta$  1,49 e 1,29, correspondiam aos carbonos em  $\delta$  25,9 e 20,6, respectivamente, e apresentavam correlações entre si e com os carbonos em  $\delta$  45,2, 91,7 e 130,9. A análise das demais correlações nos experimentos HSQC e HMBC levou à estrutura **10**, que é da substância conhecida como  $\alpha$ -dunniona (INOUE *et al.*, 1982). Essa substância apresentou rotação específica negativa no valor de  $50,4^\circ$ . Considerando que a rotação específica do enantiômero puro é de  $-90^\circ$  (CAI *et al.*, 2005), a substância obtida neste trabalho está com um excesso enantiomérico de 56% do isômero levorotatório. De acordo com estudos anteriores (COOKE *et al.*, 2006; CAI *et al.*, 2005), o isômero levogiro tem a configuração absoluta *S*, como mostrado na figura abaixo.

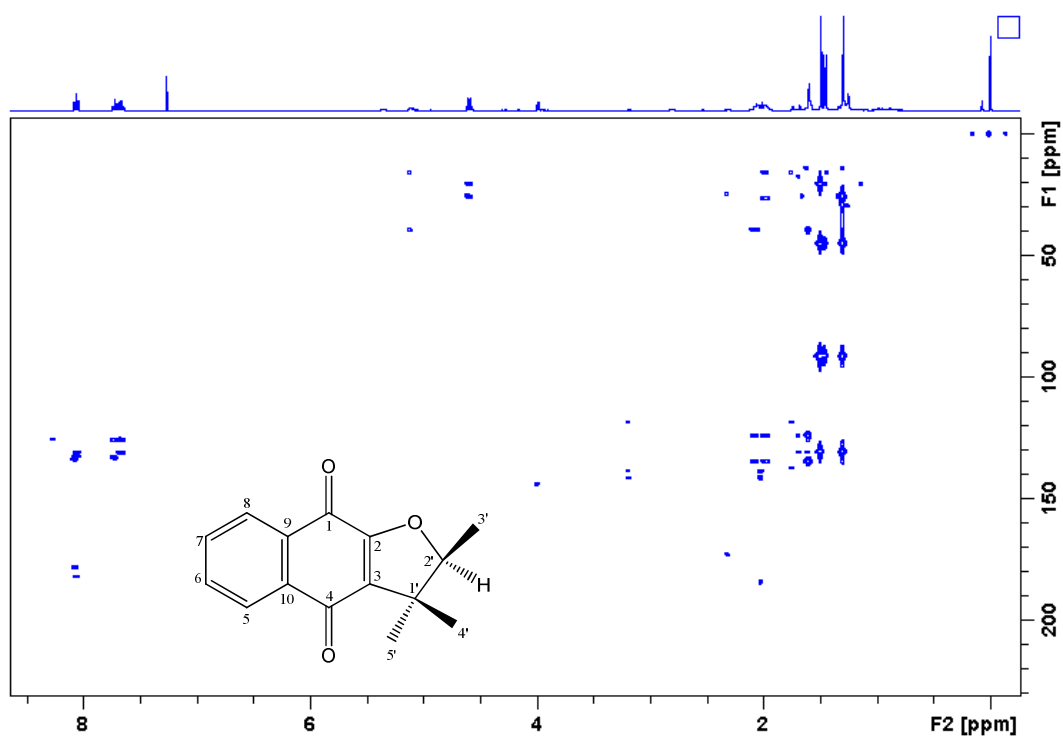


**E51** – Ampliação da região dos hidrogênios do grupo 2,3-diidro-2,3,3-trimetilfurano do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **10**, **11** e **12** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



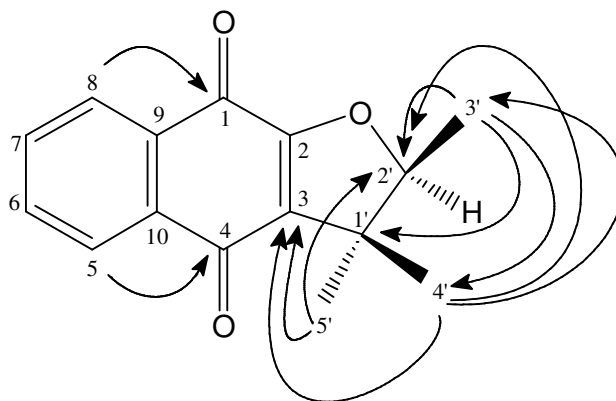


**E54** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação de **10** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



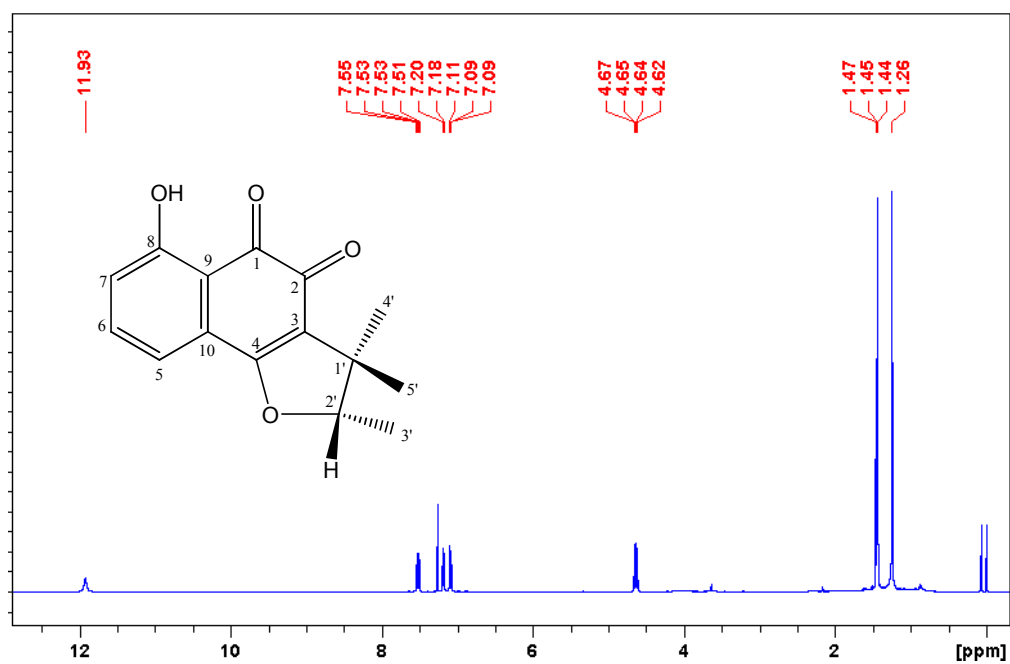
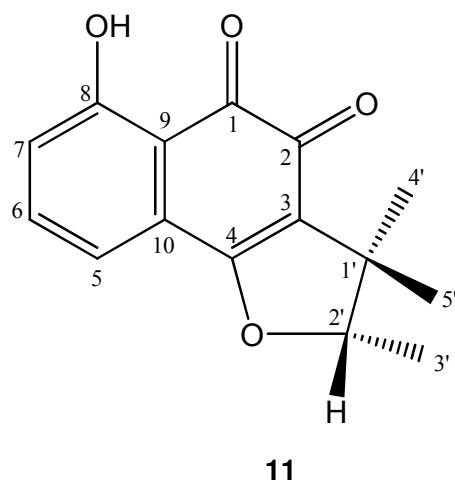
**E55** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **10** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



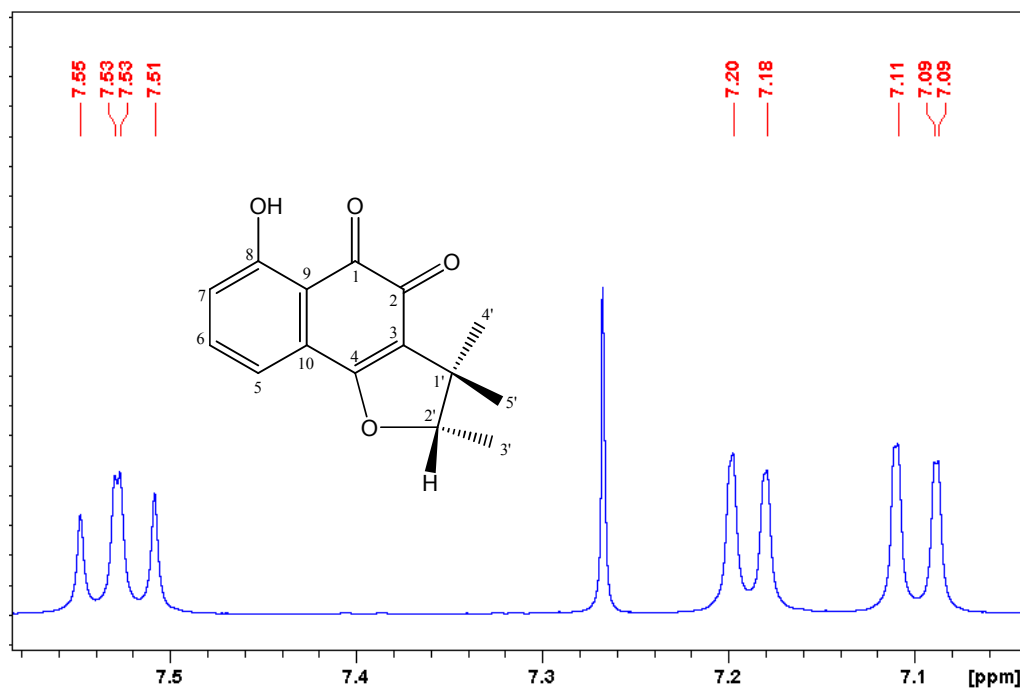


**Figura 15** – Principais correlações observadas no Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **10**

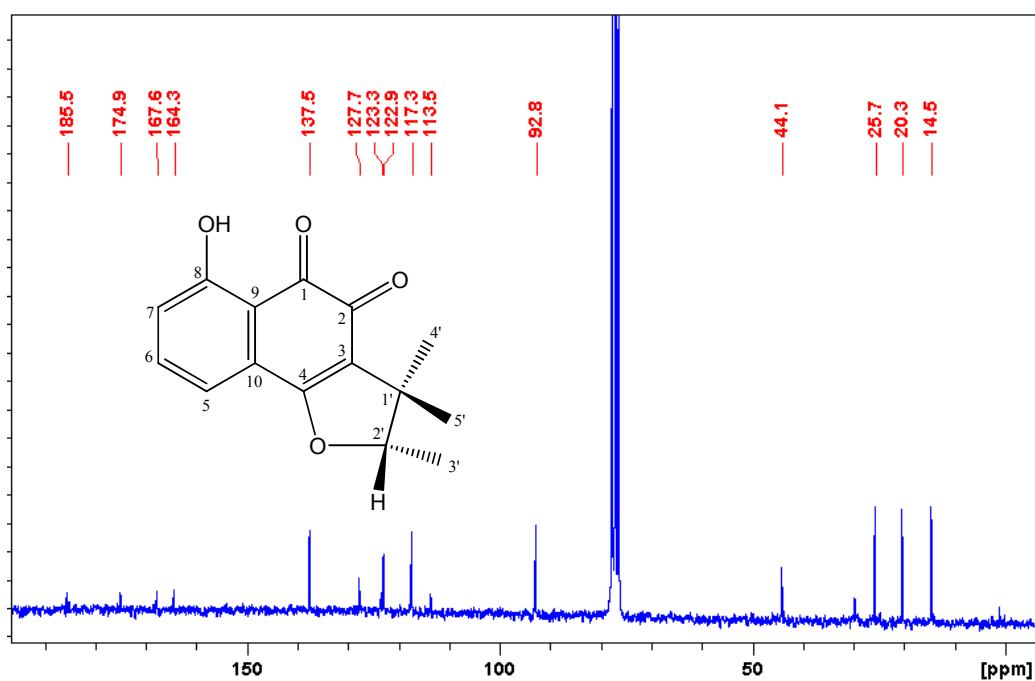
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **11** (E56 – página 73) diferiu do anterior pela presença de apenas três sinais na região de hidrogênios aromáticos, com multiplicidades e constantes de acoplamento característicos de um anel 1,2,3-trissubstituído ( $\delta$  7,53, *dd*, 8,6 e 7,3 Hz;  $\delta$  7,19, *dd*, 7,4, e 0,8 Hz;  $\delta$  7,10, *dd*, 8,6, e 0,8 Hz) (E57 – página 74). Também foi observado um simpleto largo em  $\delta$  11,92, indicativo de uma hidroxila quelada. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  (E58 – página 74), foram observados, entre outros, sinais referentes a dois grupos carbonila em  $\delta$  174,9 e 185,5. Esses deslocamentos químicos indicaram a estrutura de uma 1,2-naftoquinona. O espectro de DEPT 135 (E59 – página 75) confirmou a inexistência de grupos metilênicos. Análise dos experimentos HSQC e HMBC (E60-61 – páginas 75-76) levou à estrutura **11**, que pertence à substância conhecida como 8-hidroxidunnione (INOUE *et al.*, 1982). A maioria dos deslocamentos químicos está de acordo com aqueles publicados, exceto pelos grupos metila C-3' e C-5', que foram agora corretamente assinalados através da análise das correlações no espectro HSQC (Tabela 15 – página 80, Figura 16 – página 76). Essa substância havia sido isolada como uma mistura racêmica (INOUE *et al.*, 1982), mas agora apresentou rotação específica negativa, devendo ter a configuração absoluta *S* de acordo com estudos cristalográficos anteriores (COOKE *et al.*, 2006).



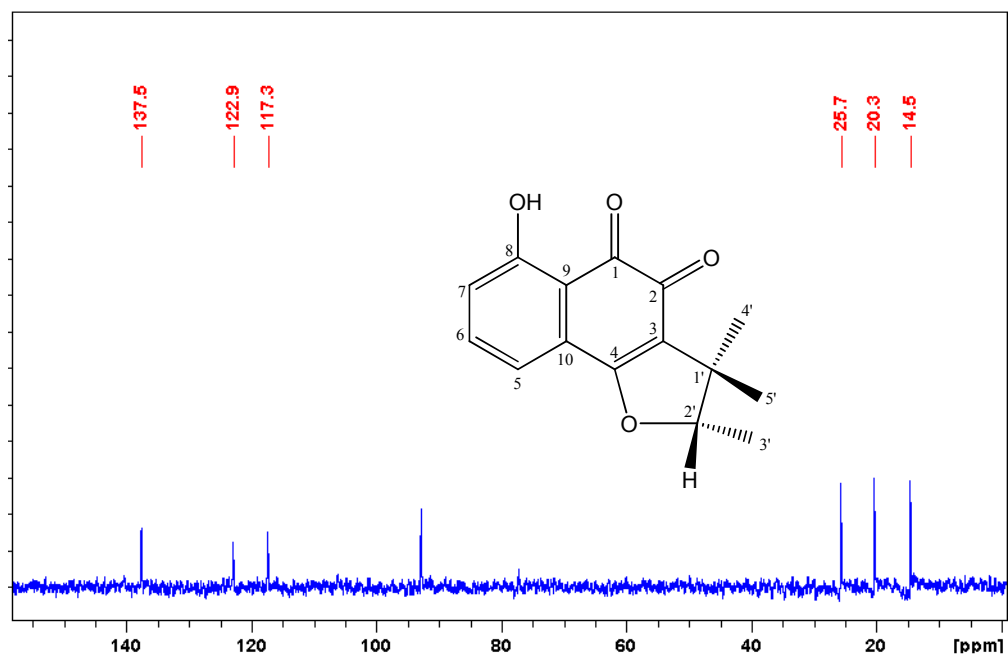
**E56** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **11** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



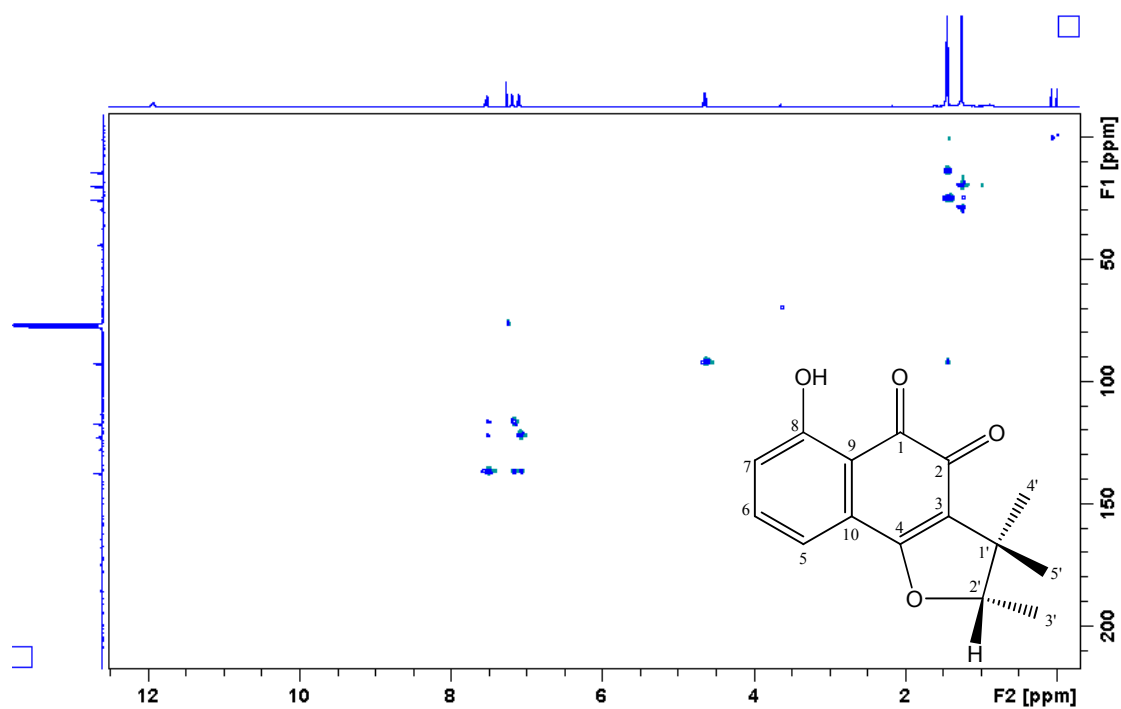
**E57** – Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **11** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



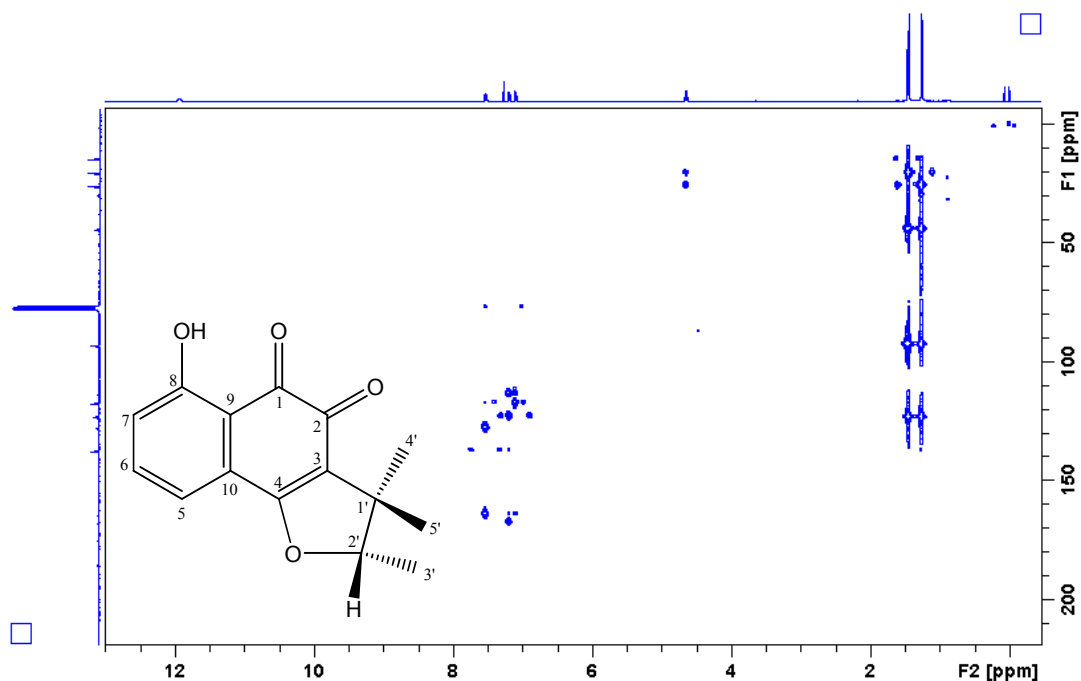
**E58** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  de **11** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)



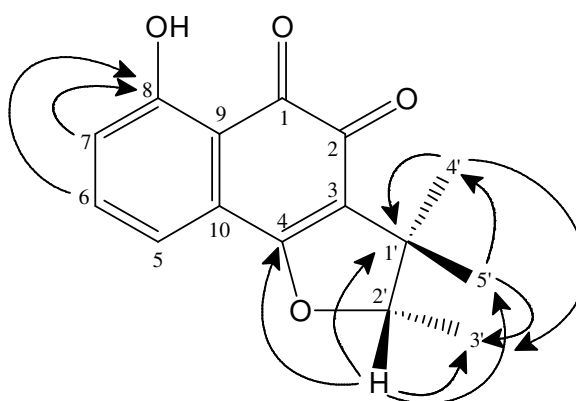
**E59** – Espectro de RMN de DEPT-135 de **11** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)



**E60** – Mapa de correlação <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C a uma ligação de **11** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



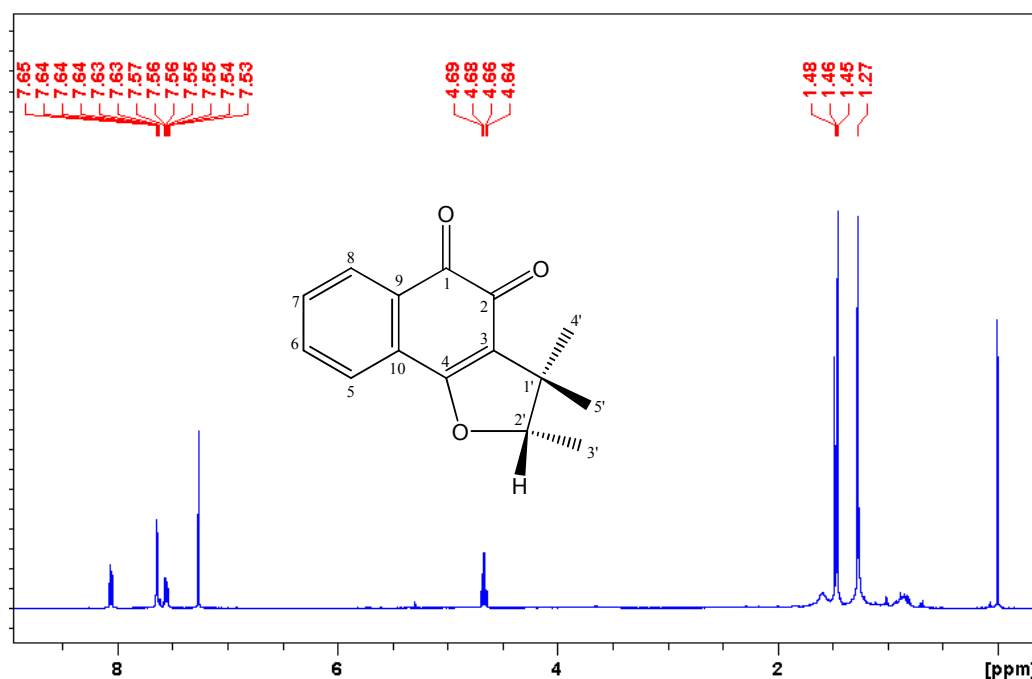
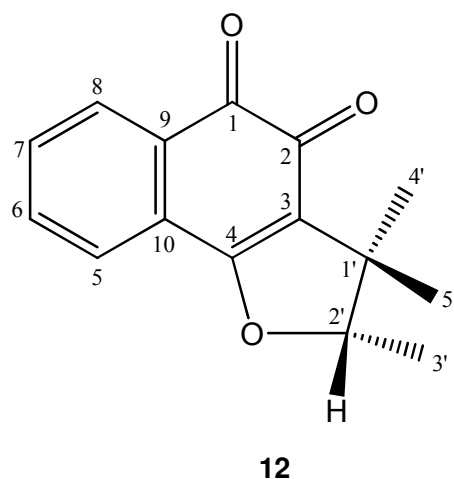
**E61** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **11** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



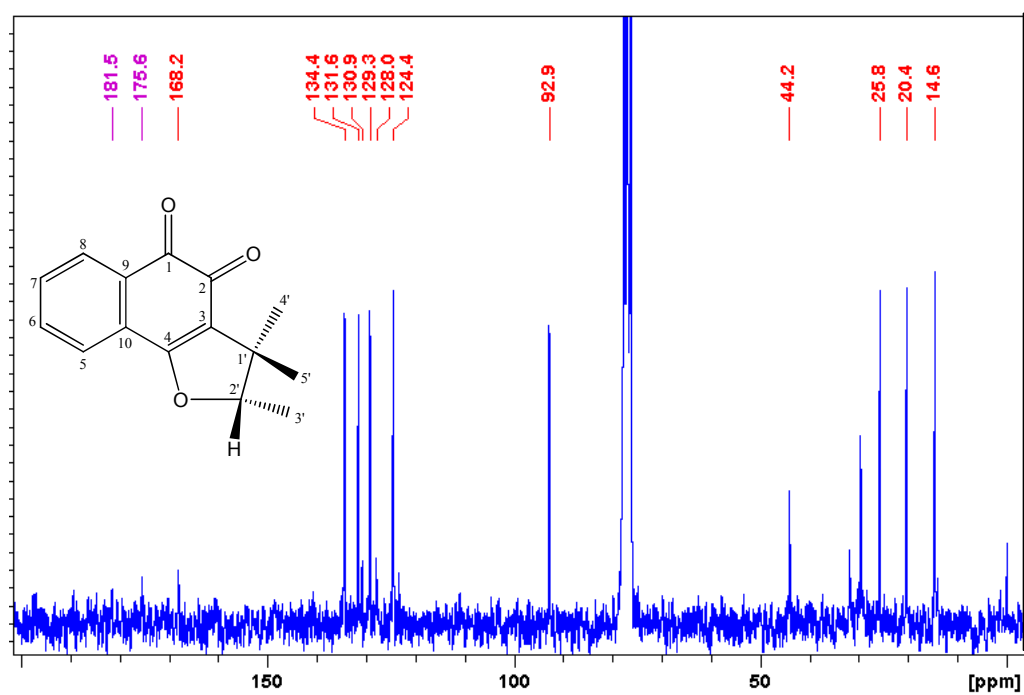
**Figura 16** – Principais correlações observadas no Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **11**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **12** (E62 – página 77) foi muito similar ao de **10**, diferindo apenas no deslocamento químico dos sinais, o que sugeriu um isômero constitucional. Analisando-se os demais espectros de RMN ( $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ , HSQC e HMBC) (E63-65 – páginas 78-79) foi proposta a estrutura **12**, que pertence à naftoquinona conhecida como dunniona (INOUE *et al.*; 1983; INOUE *et al.*; 1982). As atribuições dos deslocamentos químicos de C-9, C-10, C-3' e C-5' foram corrigidas com base nas correlações observadas

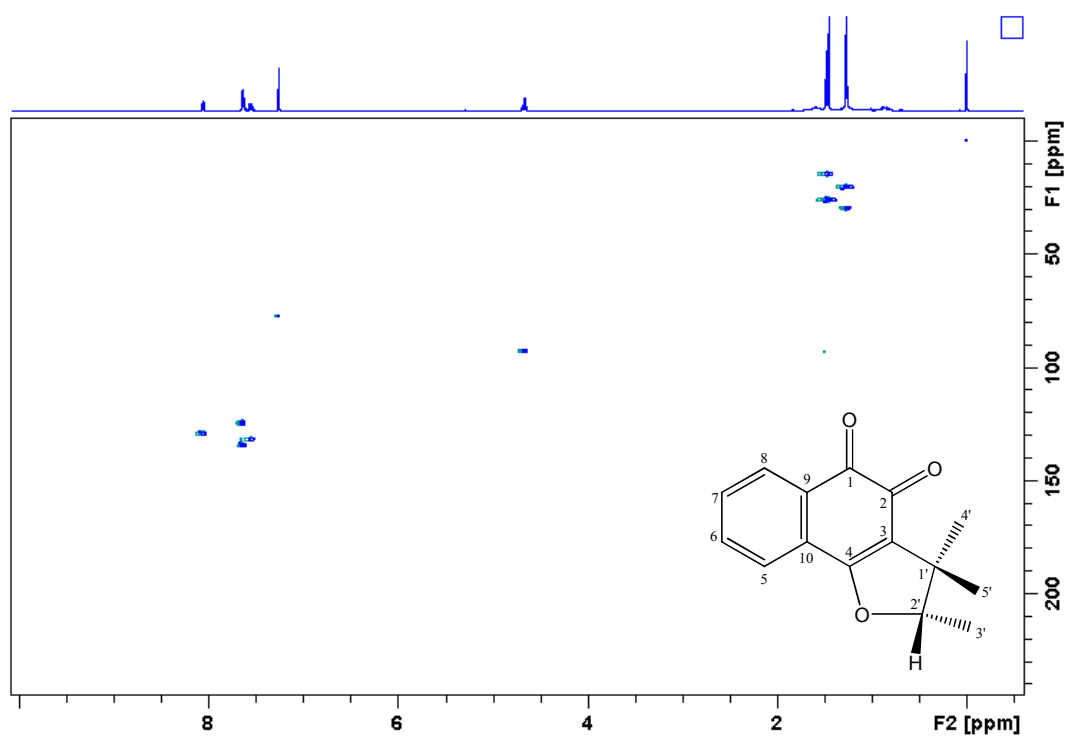
no espectro HMBC (Tabela 15 – página 80, Figura 17 – página 79). Da mesma forma que as anteriores, a substância **12** apresentou rotação específica negativa ( $-208^\circ$ ), mas inferior ao valor do enantiômero puro ( $307^\circ$ , INOUE *et al.*, 1983), indicando um excesso enantiomérico de 67,7% do enantiômero levógiro. A sua configuração absoluta também foi assinalada como *S* (COOKE *et al.*, 2006).



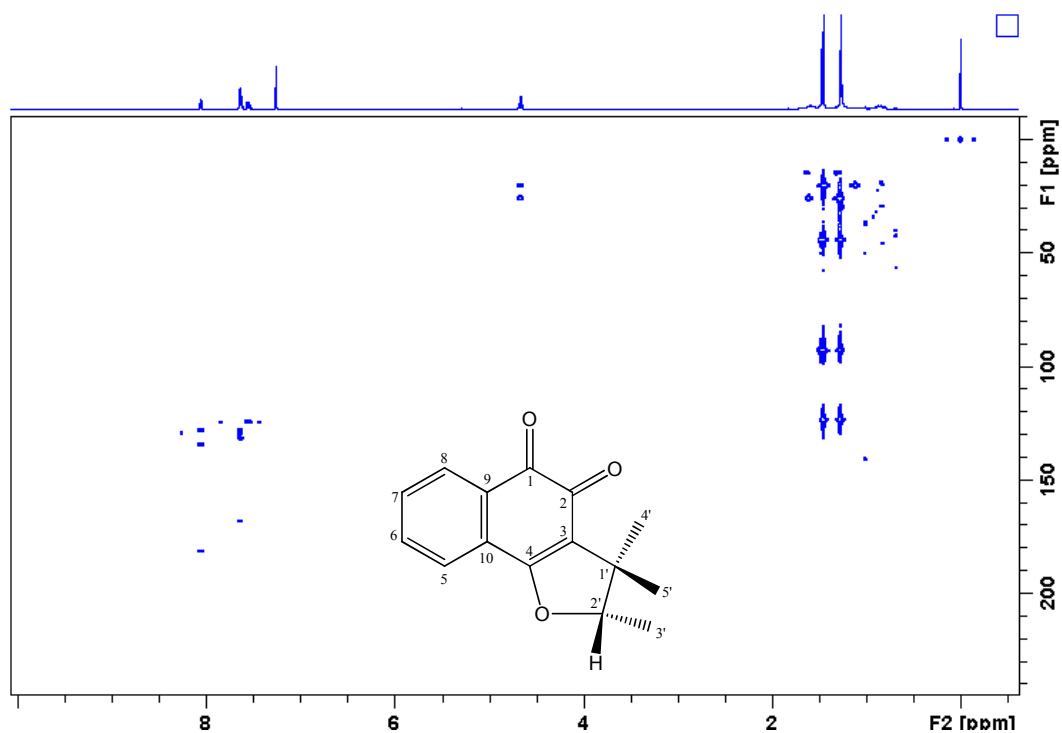
E62 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **12** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



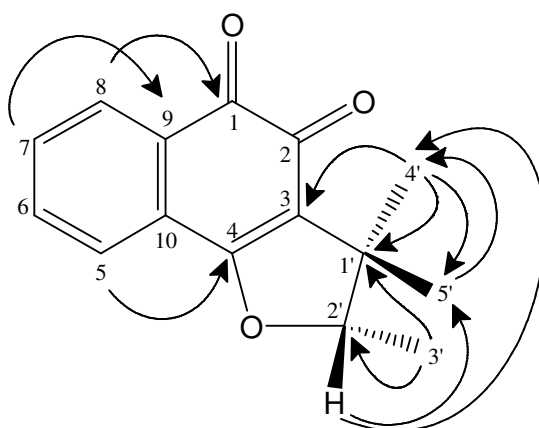
**E63** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  de **12** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)



**E64** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação de **12** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)



**E65** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **12** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



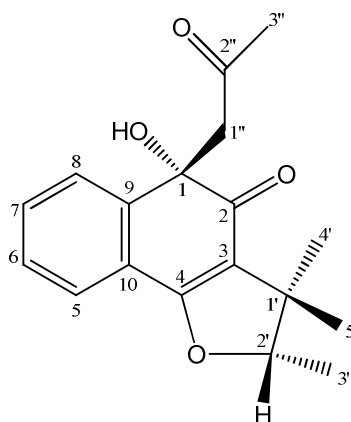
**Figura 17** – Principais correlações observadas no Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **12**

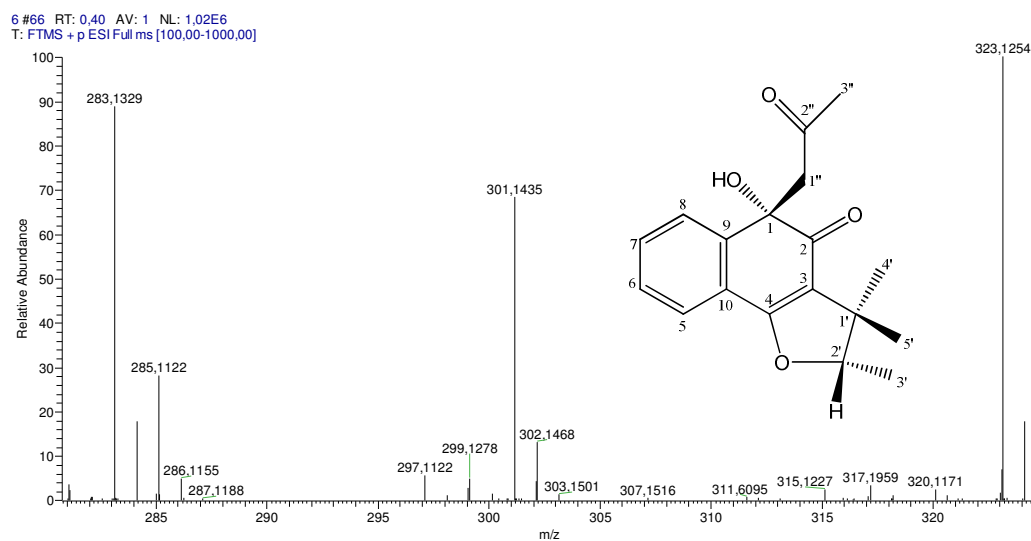


**Tabela 15** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$  de **10**, **11** e **12** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

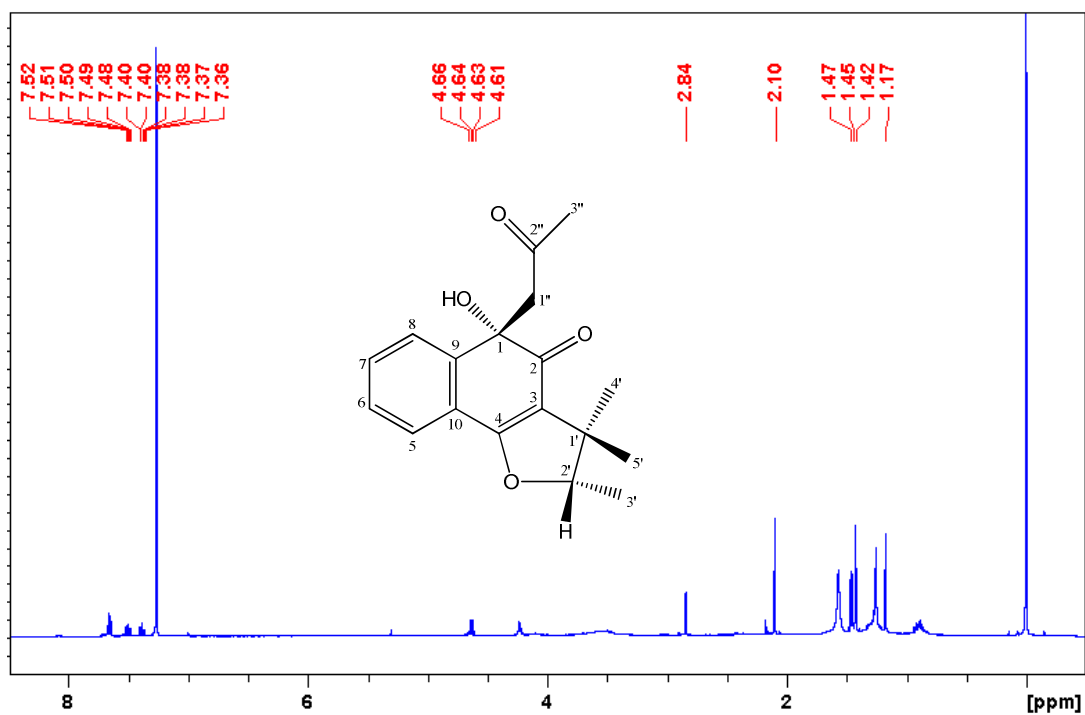
Posição	<b>10</b>			<b>11</b>			<b>12</b>		
	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$
1	-	178,7	-	-	185,5	-	-	181,4	-
2	-	158,2	-	-	174,9	-	-	175,5	-
3	-	130,9	-	-	123,5	-	-	123,4	-
4	-	182,5	-	-	167,6	-	-	168,2	-
5	8,05 ( <i>dd</i> , 7,5; 1,5)	126,2	4, 7	7,19 ( <i>dd</i> , 7,3; 0,8)	117,0	4, 6, 7, 9	7,64 ( <i>m</i> )	124,5	9, 6, 4
6	7,72 ( <i>ddd</i> , 7,6; 7,5; 1,5)	134,2	5, 8, 10	7,53 ( <i>dd</i> , 8,6; 7,3)	137,3	5, 8, 9	7,55 ( <i>m</i> )	131,6	5
7	7,66 ( <i>ddd</i> , 7,6; 7,5; 1,5)	132,8	5, 8, 9	7,10 ( <i>dd</i> , 8,6; 0,8)	122,8	5, 8, 9	7,63 ( <i>m</i> )	134,4	9, 8
8	8,07 ( <i>dd</i> , 7,5; 1,5)	126,2	1, 6	-	164,3	-	8,06 ( <i>ddd</i> , 7,6; 1,0; 1,0)	129,3	9, 7, 1
9	-	131,5	-	-	113,4	-	-	128,0	-
10	-	133,5	-	-	127,7	-	-	130,9	-
1'	-	45,2	-	-	44,2	-	-	44,2	-
2'	4,60 ( <i>q</i> , 6,7)	91,7	4', 5'	4,64 ( <i>q</i> , 6,6)	92,5	1', 3', 4, 4', 5'	4,67 ( <i>q</i> , 6,7)	92,9	4', 5'
3'	1,45 ( <i>d</i> , 6,7)	14,3	1', 2', 4'	1,46 ( <i>d</i> , 6,6)	14,4	1', 2'	1,47 ( <i>d</i> , 6,7)	14,6	1', 2'
4'	1,29 ( <i>s</i> )	20,6	1', 2', 3, 3', 5'	1,25 ( <i>s</i> )	20,3	1', 2', 3'	1,27 ( <i>s</i> )	20,4	5', 1', 2', 3
5'	1,49 ( <i>s</i> )	25,9	1', 2', 3, 4'	1,44 ( <i>s</i> )	25,4	1', 2', 3', 4'	1,45 ( <i>s</i> )	25,8	4', 1', 2', 3
OH	-	-	-	11,92 ( <i>s</i> )	-	-	-	-	-

A substância **13** foi isolada como um sólido vermelho, e teve a fórmula molecular  $C_{18}H_{20}O_4$  através do espectro de massas de alta resolução (E66 – página 82), que apresentou um pico em  $m/z$  301,1435 ( $[M+1]^+$ ). O seu espectro de RMN de  $^1H$  (E67 – página 82) apresentou sinais para quatro hidrogênios ( $\delta$  7,34, 7,50, 7,65 e 7,66), formando um conjunto de spin, com multiplicidades e constantes de acoplamento típicos de um anel aromático 1,2-dissubstituído, além dos sinais do grupo 2,3-diidro-2,3,3-trimetilfurano. Estes dados apontaram para uma naftoquinona tipo dunniona, como **10** ou **12**. Entretanto, a presença de dois simpletos em  $\delta$  2,84 (2H) e 2,10 (3H) sugeria alguma feição estrutural diferente (E68 – página 83). Os sinais destes hidrogênios foram associados aos respectivos carbonos ( $\delta$  57,9 e 32,1) através do espectro HSQC (E69 – página 84). Algumas das correlações observadas no espectro HMBC (E70 – página 84, Tabela 16 – página 85, Figura 18 – página 85) confirmaram um anel aromático 1,2-dissubstituído ligado a um anel 2,3-diidro-2,3-trimetilfurano, como em **12**. Entretanto os sinais dos grupos carbonila foram observados em 196,5 e 205,6 ppm, sendo completamente diferentes daqueles anteriormente encontrados para **12**. O grupo metileno em  $\delta$  2,84 (H-1'') mostrou correlação com os carbonos em  $\delta$  77,5, 144,1, 196,5 e 205,6, enquanto que o grupo metila em  $\delta$  2,10 (H-3'') mostrou correlação com o carbono em 205,6 ppm. A partir desses dados foi proposta a estrutura **13**, cuja estereoquímica relativa foi determinada por análises de NOE. Assim a irradiação do hidrogênio em  $\delta$  4,63 levou à intensificação dos sinais dos grupos metila em  $\delta$  1,42 e 1,46, enquanto que a irradiação do grupo metila em  $\delta$  1,17 causou intensificação dos sinais em  $\delta$  1,42 e 1,46. Por outro lado, a irradiação do hidrogênio em 2,84 causou aumento da intensidade dos sinais em  $\delta$  2,10 e 7,66, confirmando a proximidade desses hidrogênios. Esta substância é inédita na literatura e, foi denominada allagophyllona.

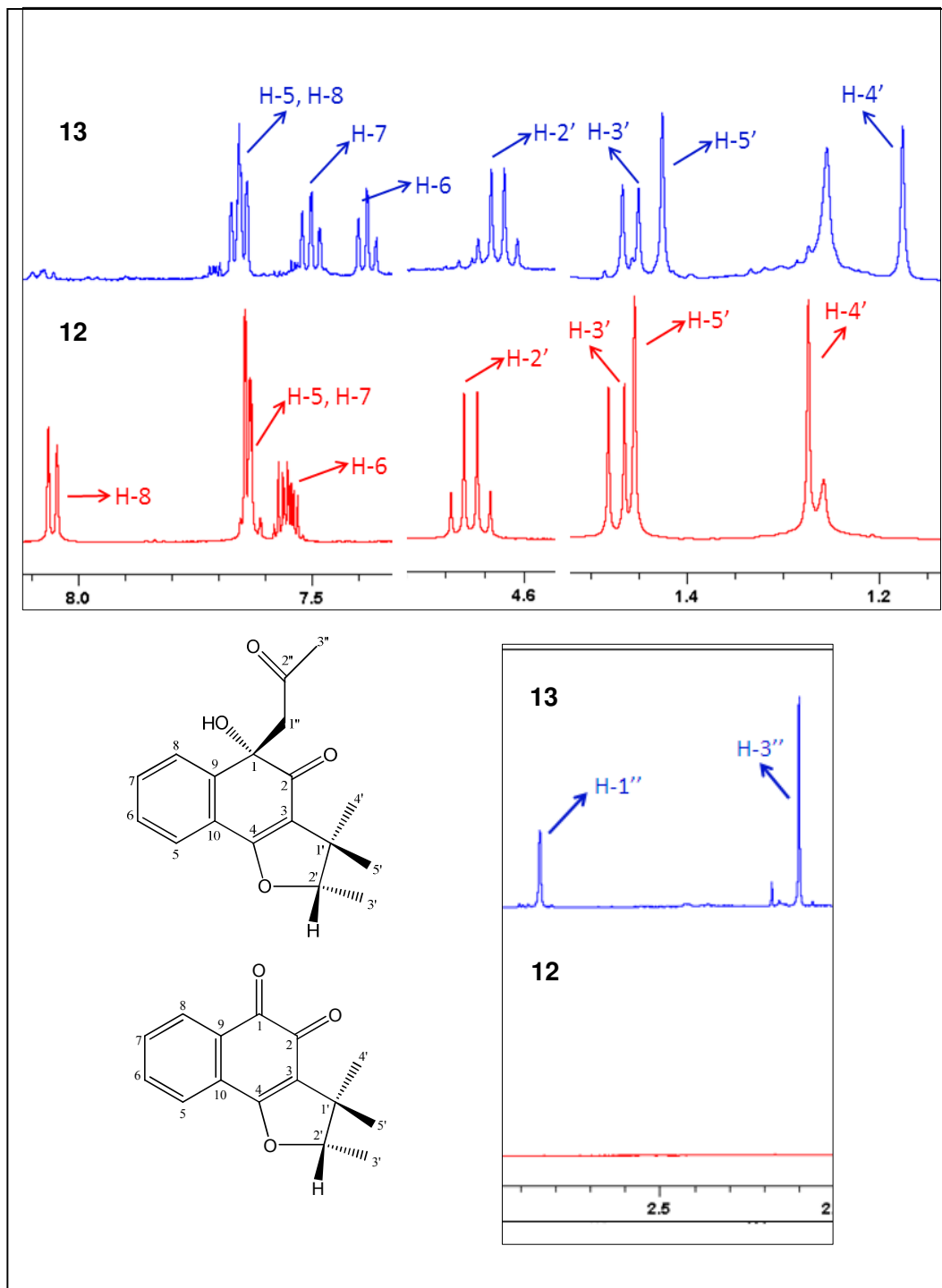
**13**



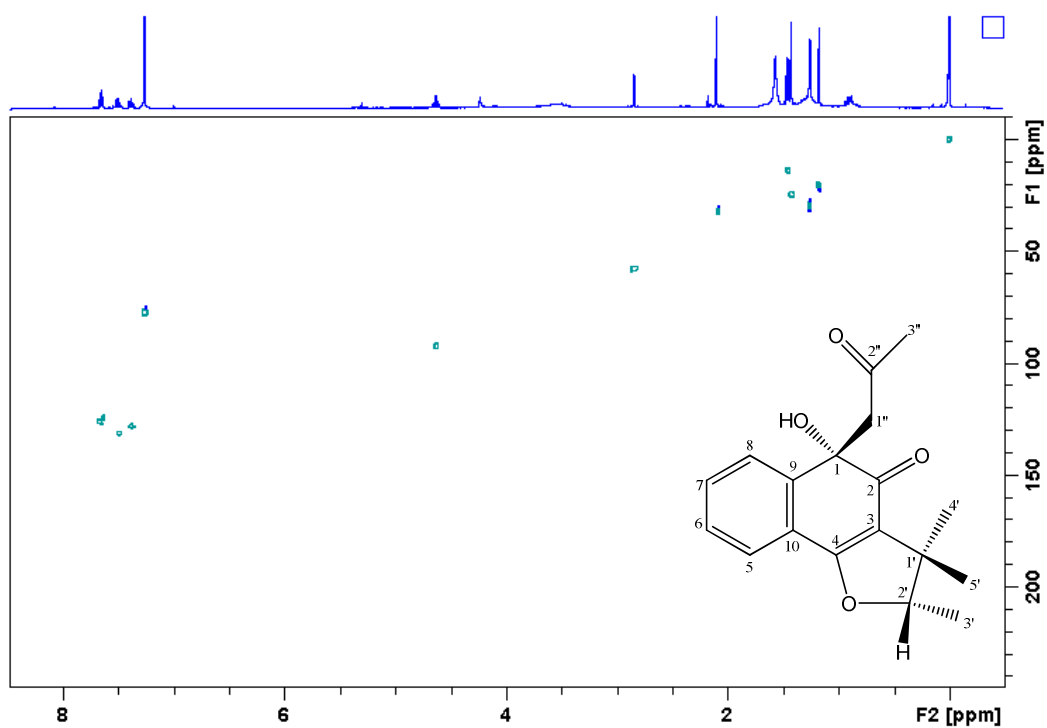
**E66** – Espectro de massas de alta resolução da substância **13**



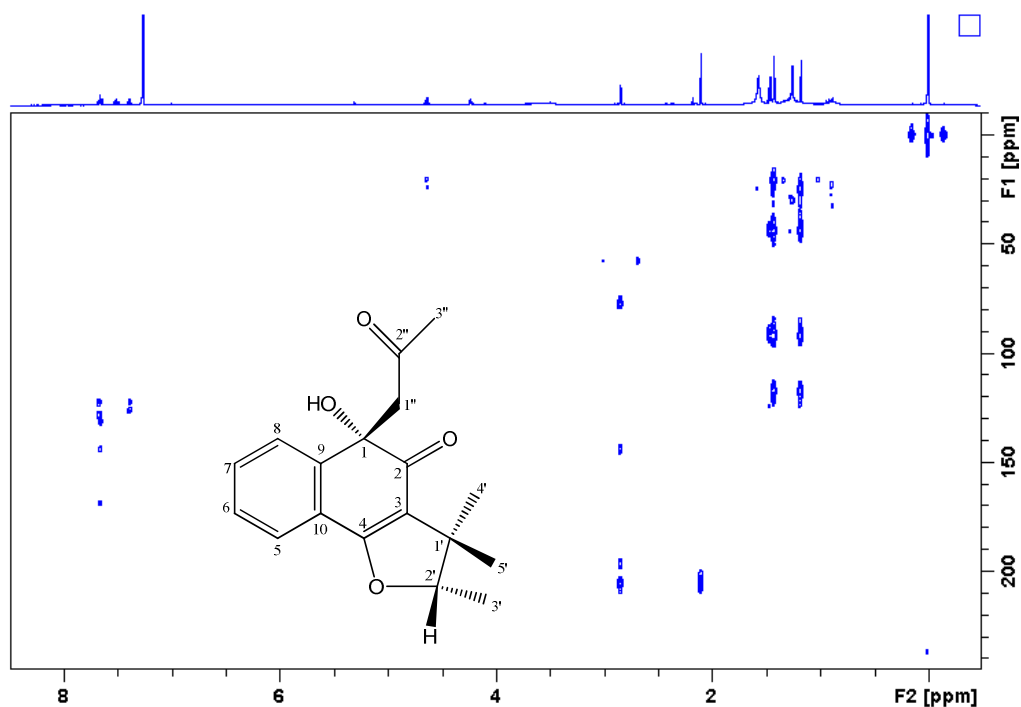
**E67** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **13** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



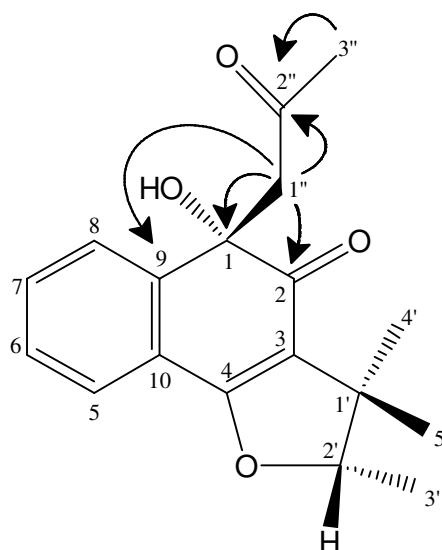
**E68** – Comparação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de **12** e **13** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E69** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação de **13** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E70** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **13** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

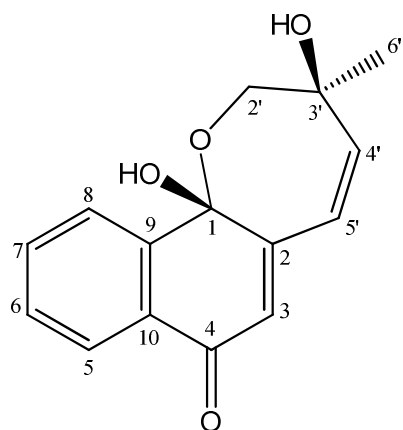


**Figura 18** – Principais correlações observadas no Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **13**

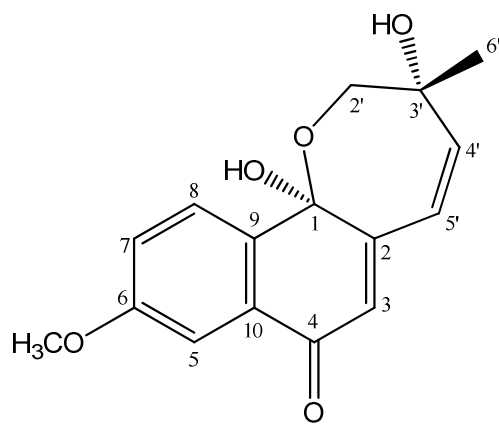
**Tabela 16** – Dados de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$  de **13** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (m, $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$
1	-	77,5	-
2	-	196,5	-
3	-	117,4	-
4	-	168,9	-
5	7,65 ( <i>dl</i> , 7,6)	124,4	7, 9, 4
6	7,34 ( <i>dt</i> , 1,1; 7,6)	128,1	10, 8
7	7,50 ( <i>dt</i> , 1,4; 7,6)	131,5	9
8	7,66 ( <i>dl</i> , 7,6)	126,2	10, 6
9	-	144,1	-
10	-	122,6	-
1'	-	44,1	-
2'	4,63 ( <i>q</i> , 6,6)	92,1	5', 4'
3'	1,46 ( <i>d</i> , 6,6)	14,0	1', 2'
4'	1,17 ( <i>s</i> )	20,6	5', 1', 2', 3
5'	1,42 ( <i>s</i> )	24,6	4', 1', 2', 3
1''	2,84 ( <i>s</i> )	57,9	1, 9, 2, 2''
2''	-	205,6	-
3''	2,10 ( <i>s</i> )	32,1	2''

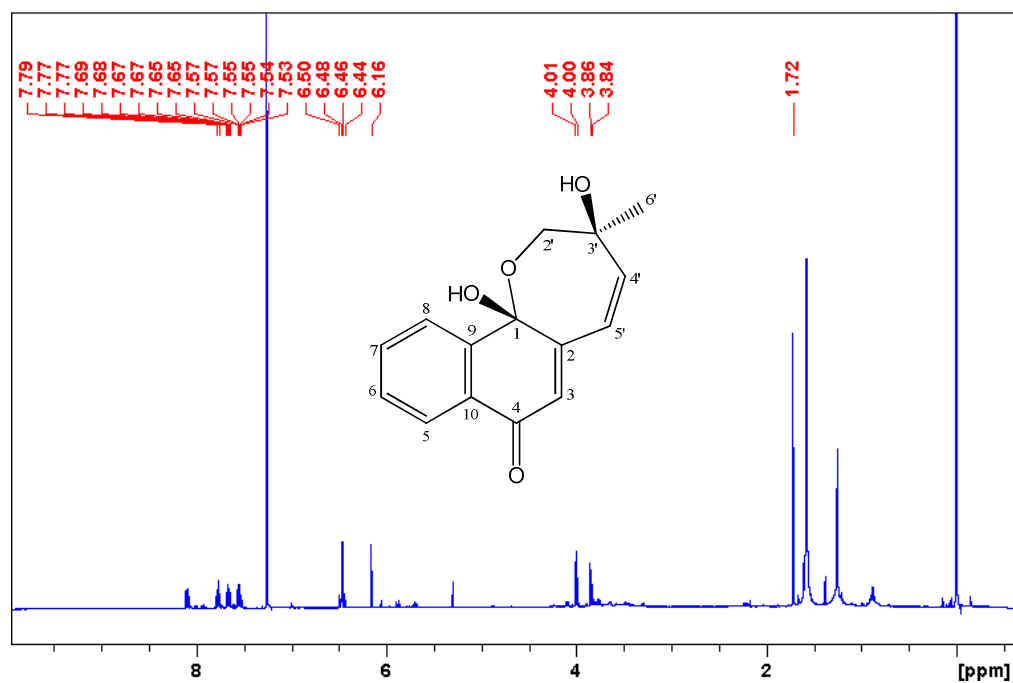
As substâncias **14** e **15** foram isoladas como óleos amarelos e, apresentaram dados espectrais similares. Os seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (E71-72 – páginas 87-88) apresentaram sinais de hidrogênios ligados a anéis aromáticos ( $\delta$  6,1-8,1), hidrogênios olefínicos ( $\delta$  6,5, *d*), um grupo oximetilênico ( $\delta$  3,8 e 4,0, *d*) e, um grupo metila ( $\delta$  1,7, *s*). Os experimentos HSQC e HMBC (E74-76 – páginas 88-90) mostraram que os hidrogênios do grupo metila estavam ligados a um carbono em  $\delta$  19,6 e apresentavam correlações com os carbonos em  $\delta$  75, 81 e 141. Por outro lado, os hidrogênios oximetilênicos estavam ligados ao carbono em  $\delta$  75 e apresentavam correlações com os carbonos  $\delta$  19,6, 81, 99 e 141. Este conjunto de dados pode ser considerado de diagnóstico para o esqueleto de uma hidronaftoquinona com um anel de sete membros, como na substância aggregatina D, anteriormente isolada de *Sinningia aggregata* (VERDAN *et al.*, 2010). **14** e **15** diferem da aggregatina D pela ausência de um grupo prenila em C-3, e diferem entre si pela substituição no anel aromático. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  de ambas foi observado um simpleto em aproximadamente  $\delta$  6,1, que apresenta correlação com os carbonos em  $\delta$  99 (C-1), 126 (C-5') e 132 (C-10). No espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **14** foram observados sinais para 4 hidrogênios, em um conjunto de spin, típico de um anel aromático 1,2-dissubstituído, enquanto que no espectro de **15** surgem sinais para três hidrogênios, com multiplicidades e constantes de acoplamento indicativos de um anel aromático 1,2,4-trissubstituído, acompanhado de um sinal referente a um grupo metoxila (E73 – página 89. Considerando esses dados, e as demais correlações nos experimentos HSQC e HMBC (Tabela 17 – página 93, Figura 19 – página 91), foram propostas as estruturas **14** e **15**. Os espectros de massas de alta resolução (E78-79 – página 92) apresentaram um pico em  $m/z$  265,10477 ( $[\text{M}+\text{Li}]^+$ ,  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{Li}$ ) para **14** e em  $m/z$  295,11508 ( $[\text{M}+\text{Li}]^+$ ,  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{Li}$ ) para **15**, apoiando as estruturas propostas. Essas substâncias são inéditas e foram denominadas aggregatina E (**14**) e 6-metoxiaggregatina E (**15**). A estereoquímica de **14** e **15** foi determinada por comparação com os dados da aggregatina D, cuja configuração absoluta foi anteriormente determinada como 1*R*, 3'*S* para o isômero levógiro (VERDAN *et al.*, 2010). A substância **15** também foi levógira, mas **14** foi dextrógira, sugerindo que a **14** e **15** teriam configurações absolutas opostas. Portanto, a configuração absoluta de **14** foi assinalada como 1*S*, 3'*R* e a de **15** como 1*R*, 3'*S*.



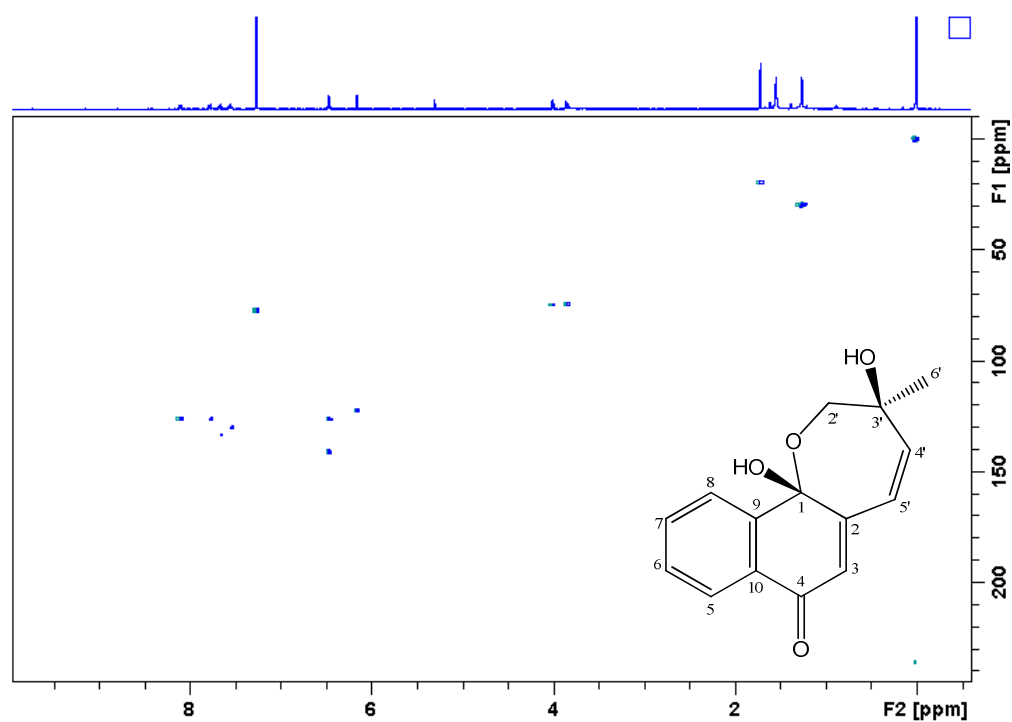
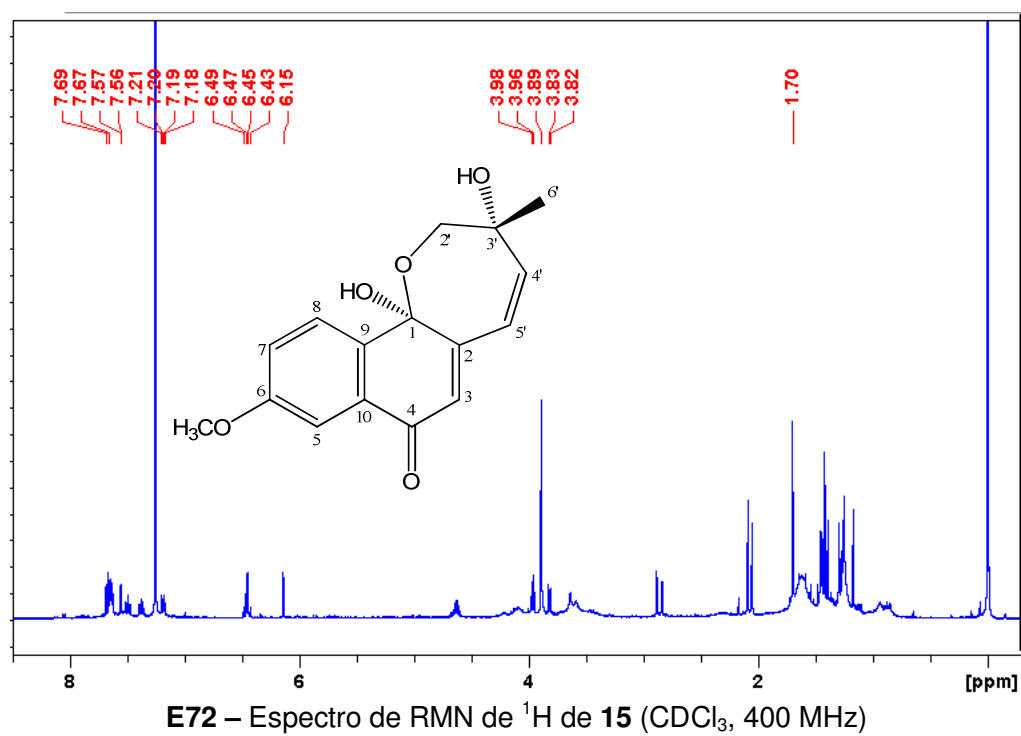
14

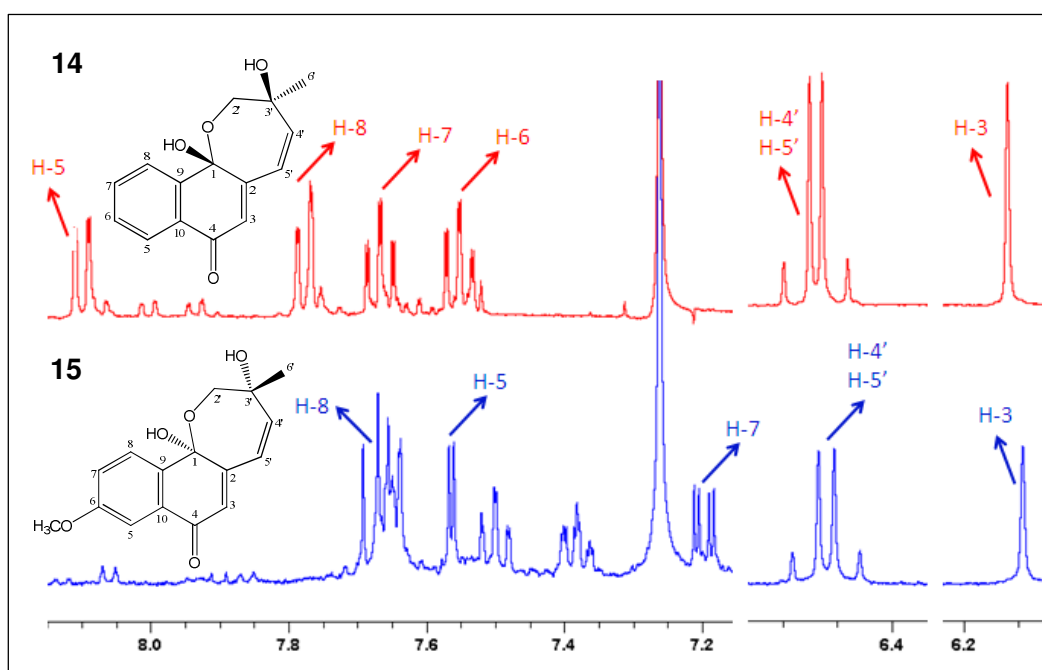
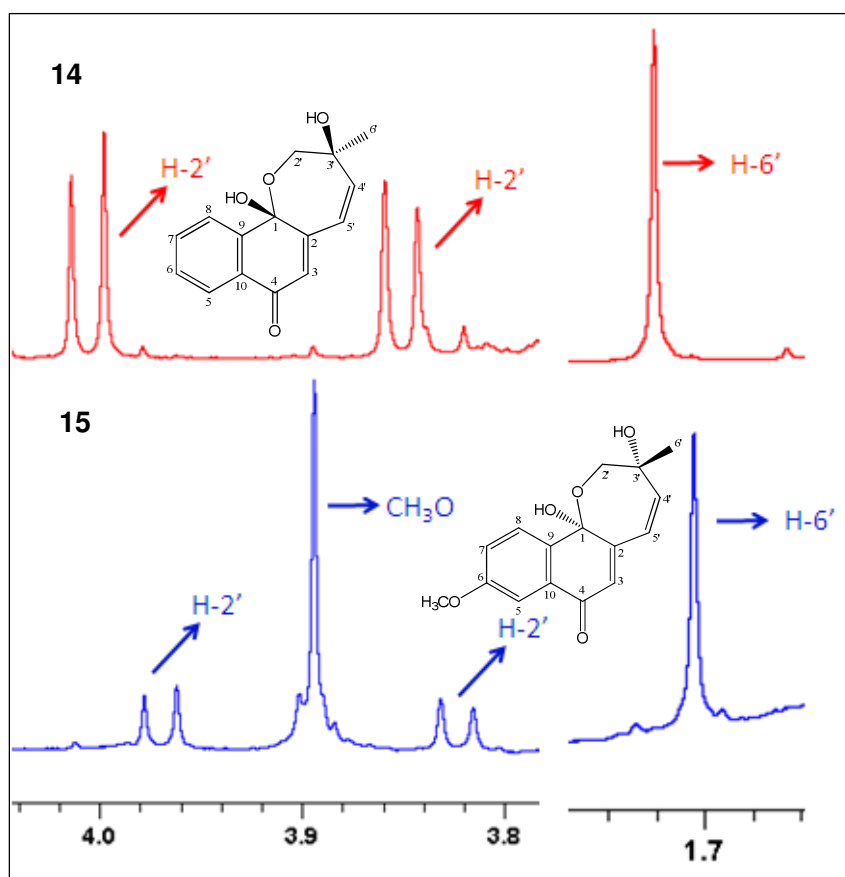


15

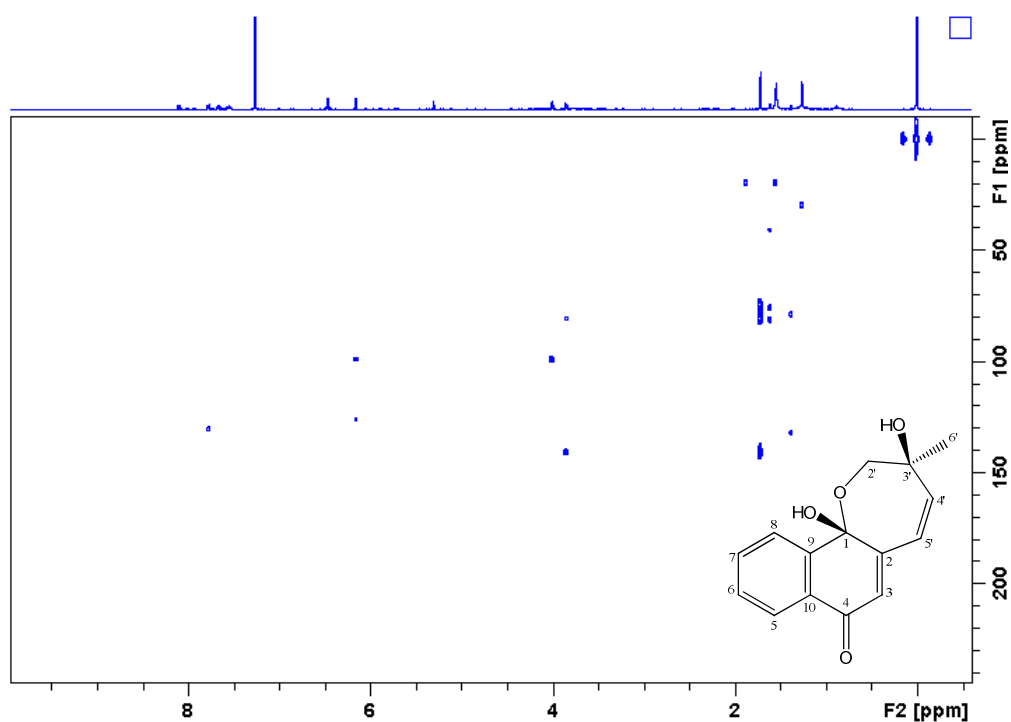
E71 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 14 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



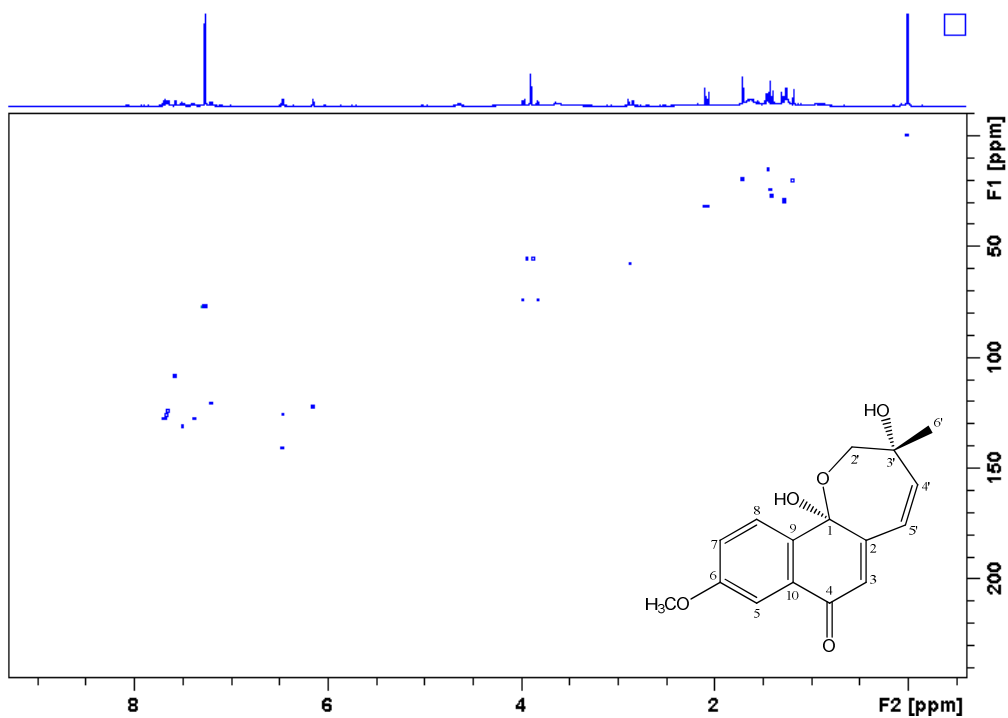




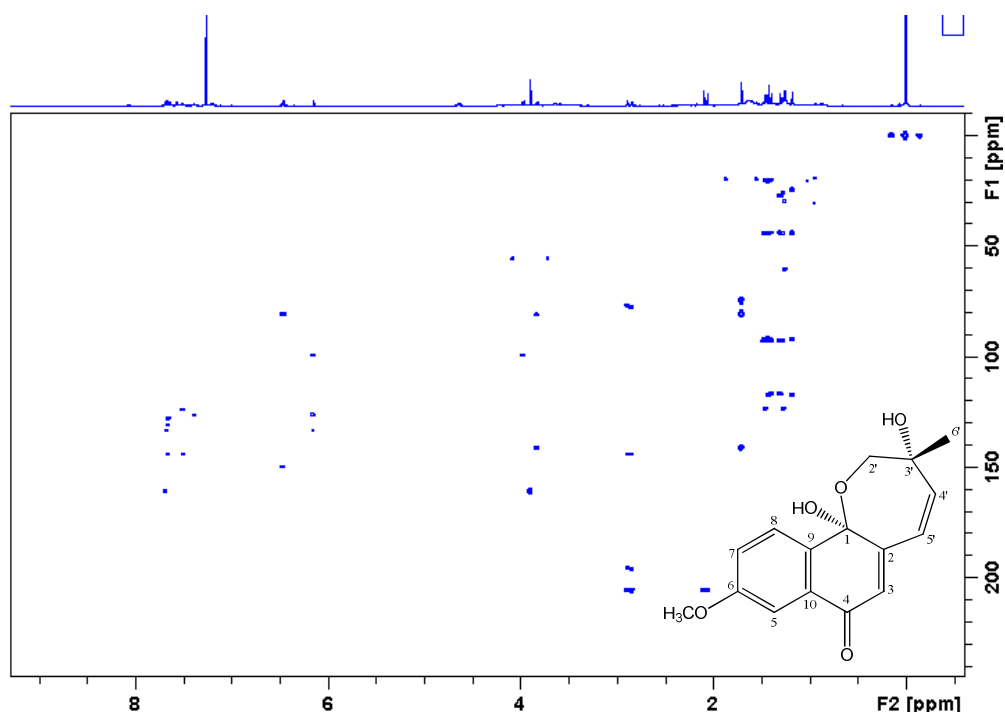
**E73** – Comparação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de **14** e **15** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



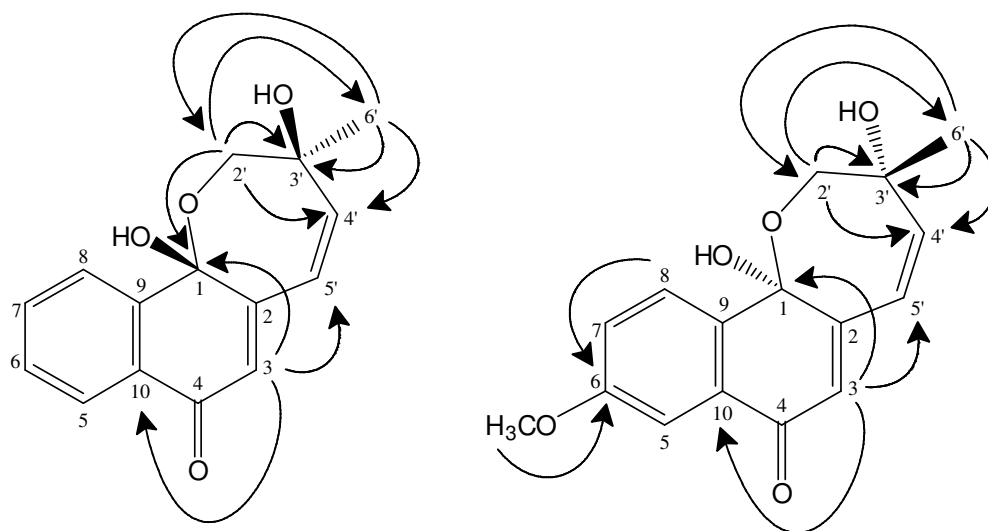
**E75** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **14** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E76** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação de **15** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

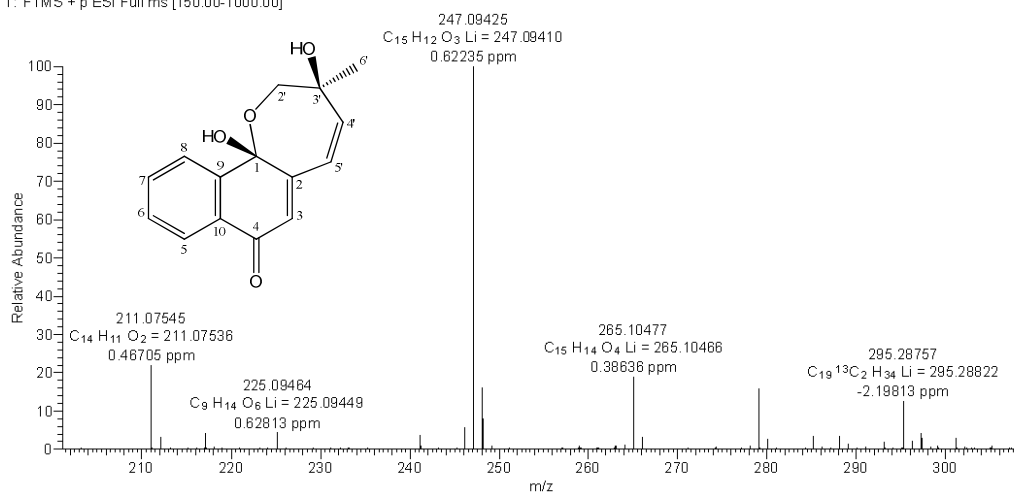


**E77** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **15** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



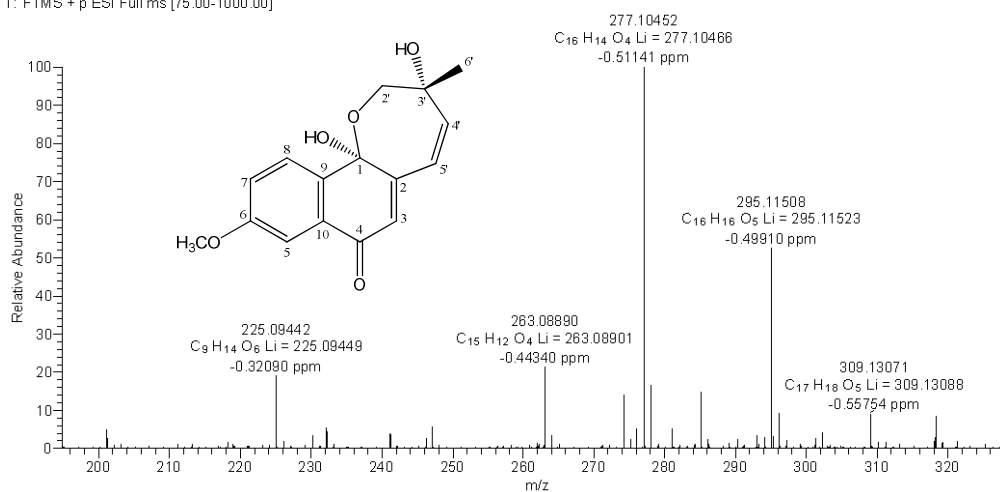
**Figura 19** – Principais correlações observadas no Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **14** e **15**

MARIA\_H\_SAA111625B #329 RT: 1.81 AV: 1 NL: 1.50E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-1000.00]



**E78 – Espectro de massas de alta resolução da substância 14**

MARIA\_H\_SAL347A #168 RT: 0.67 AV: 1 NL: 3.73E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [75.00-1000.00]



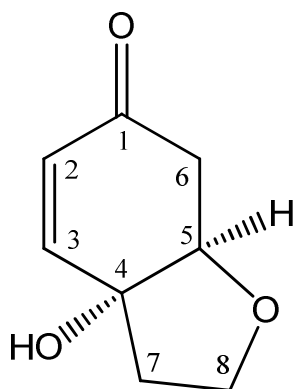
**E79 – Espectro de massas de alta resolução da substância 15**

**Tabela 17** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$  de **14** e **15** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

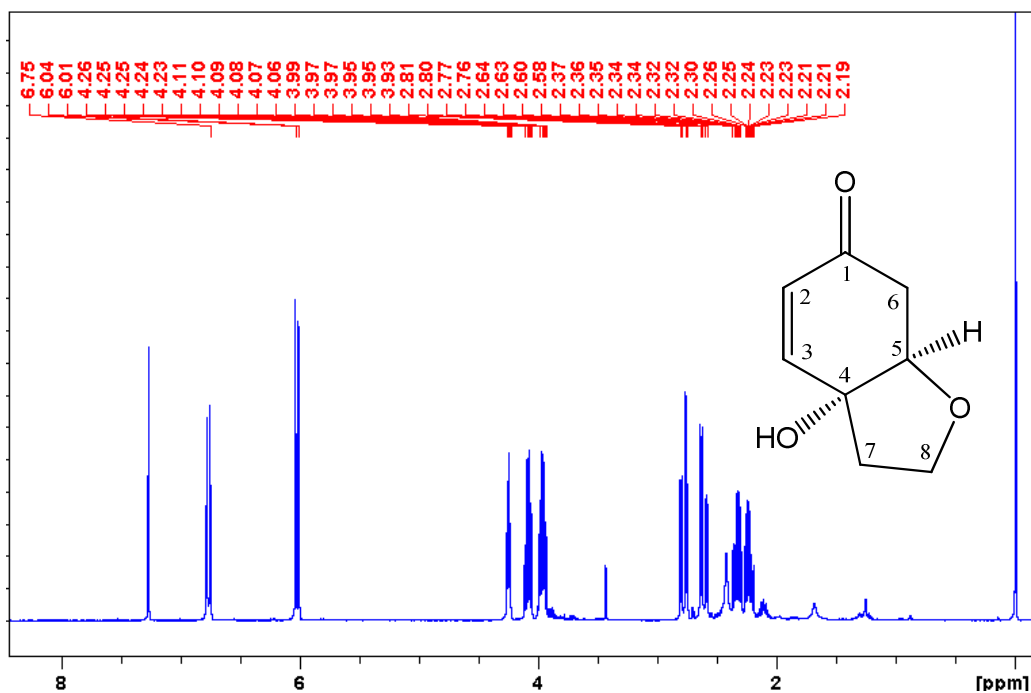
Posição	<b>14</b>			<b>15</b>		
	$\delta_{\text{H}}$ (m, $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (m, $J$ em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$
1	-	99,2	-	-	99,2	-
2	-	149,4	-	-	149,6	-
3	6,16 (s)	122,6	1, 5', 10	6,15 (s)	122,2	1, 5', 10
4	-	184,4	-	-	184,2	-
5	8,10 ( <i>ddd</i> , 7,8; 1,3; 0,9)	126,3	7	7,56 (d, 2,7)	108,3	7, 9
6	7,55 ( <i>ddd</i> , 7,6; 7,5; 1,3)	130,2	8, 10	-	160,9	-
7	7,67 ( <i>ddd</i> , 7,6; 7,5; 1,3)	133,2	8, 9	7,20 (dd, 2,7, 8,5)	120,8	
8	7,78 ( <i>dd</i> , 7,6; 1,0)	126,4	1, 6	7,68 (d, 8,5)	127,6	1, 10, 6
9	-	137,3	-	-	130,0	-
10	-	131,8	-	-	133,1	
2'	3,85 e 4,00 ( <i>d</i> , 6,5)	74,8	6', 3', 4', 1	3,83 e 3,97 (d, 6,5)	74,0	6', 3', 4'
3'	-	81,0	-	-	80,8	-
4'	6,49 ( <i>d</i> , 9,5)	140,9	2	6,44 (d, 9,6)	141,0	3'
5'	6,45 ( <i>d</i> , 9,5)	126,2	3'	6,48 (d, 9,6)	125,9	3', 2
6'	1,72 (s)	19,7	2', 3', 4'	1,70 (s)	19,6	2', 3', 4'
H <sub>3</sub> CO-6	-	-	-	3,89 (s)	55,7	6

### 3.2.5. Identificação de 16 – Iridóide

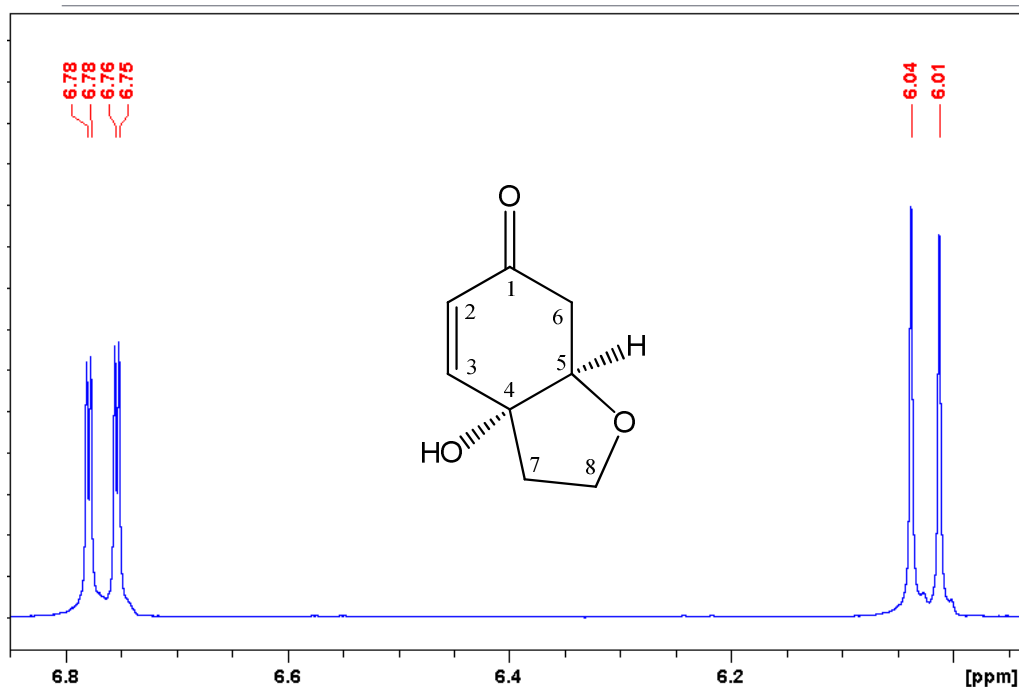
Esta substância, isolada como um óleo avermelhado, apresentou em seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E80 – página 95) sinais para dois hidrogênios olefínicos,  $\delta$  6,77 (1H, *dd*, 10,2:1,4 Hz) e  $\delta$  6,02 (1H, *d*, 10,2 Hz) (E81 – página 95), um grupo oximetínico  $\delta$  4,24 (1H, *ddd*, 5,8:4,7:1,4 Hz) (E82 – página 96), um grupo oximetilênico  $\delta$  4,08 (1H, *ddd*, 8,6:8,3:6,6 Hz) e  $\delta$  3,95 (1H, *ddd*, 8,6:8,1:6,4 Hz) (E83 – página 96), além de dois grupos metilênicos,  $\delta$  2,77 (1H, *dd*, 16,8:4,7 Hz),  $\delta$  2,61 (1H, *dd*, 16,8:5,8 Hz) e  $\delta$  2,33 (1H, *ddd*, 13,1:8,3:6,4 Hz),  $\delta$  2,22 (1H, *ddd*, 13,1:8,1:6,6 Hz) (E84 – página 97). Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 (E85-86 – páginas 97-98) foi observada a presença de oito carbonos, sendo três metilênicos ( $\delta$  39,0, 39,6 e 66,0), três metínicos ( $\delta$  80,8, 127,8 e 149,0) e dois quartenários, um dos quais oxigenado ( $\delta$  74,4) e outro correspondendo a uma carbonila  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturada ( $\delta$  197,8). No espectro HMBC, os hidrogênios em  $\delta$  6,77 (H-3) e 4,24 (H-5) apresentaram correlações entre seus carbonos e com os carbonos em 39,0 (C-7), 74,4 (C-4) e 197,8 (C-1). A partir desses dados e das demais correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas a uma ligação e a longa distância (E87-88 – páginas 98-99, Tabela 18 – página 100, Figura 20 – página 99), foi proposta a estrutura **16**, que corresponde ao iridoide conhecido como halleridona ou rengiolona (MESSANA *et al.*, 1984; BELLAKHDAR *et al.*, 1988).



**16**

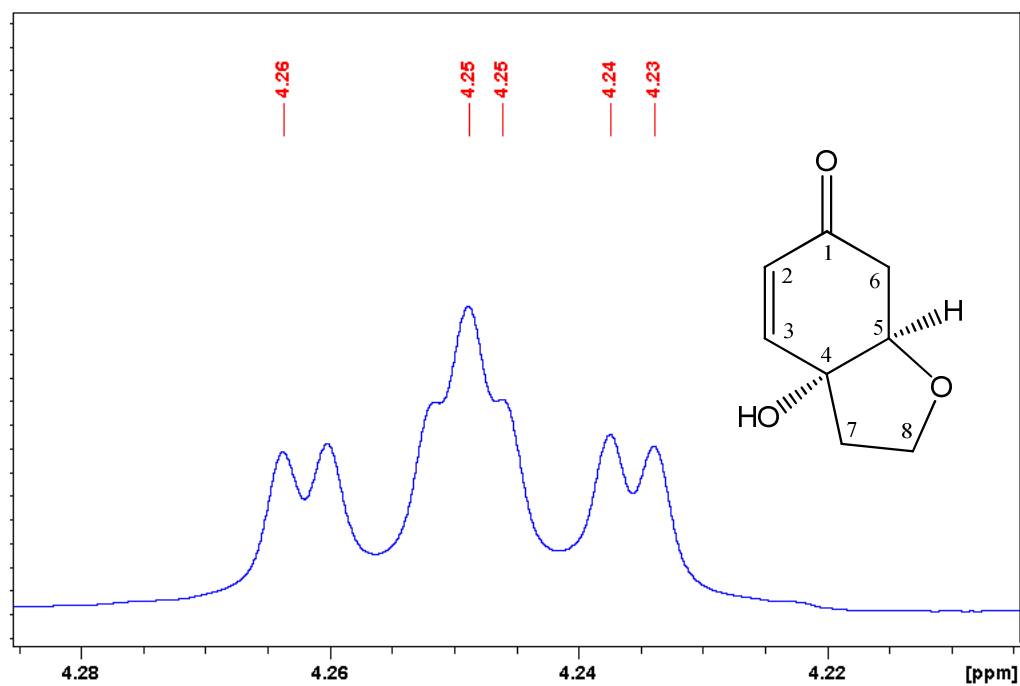


**E80** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **16** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

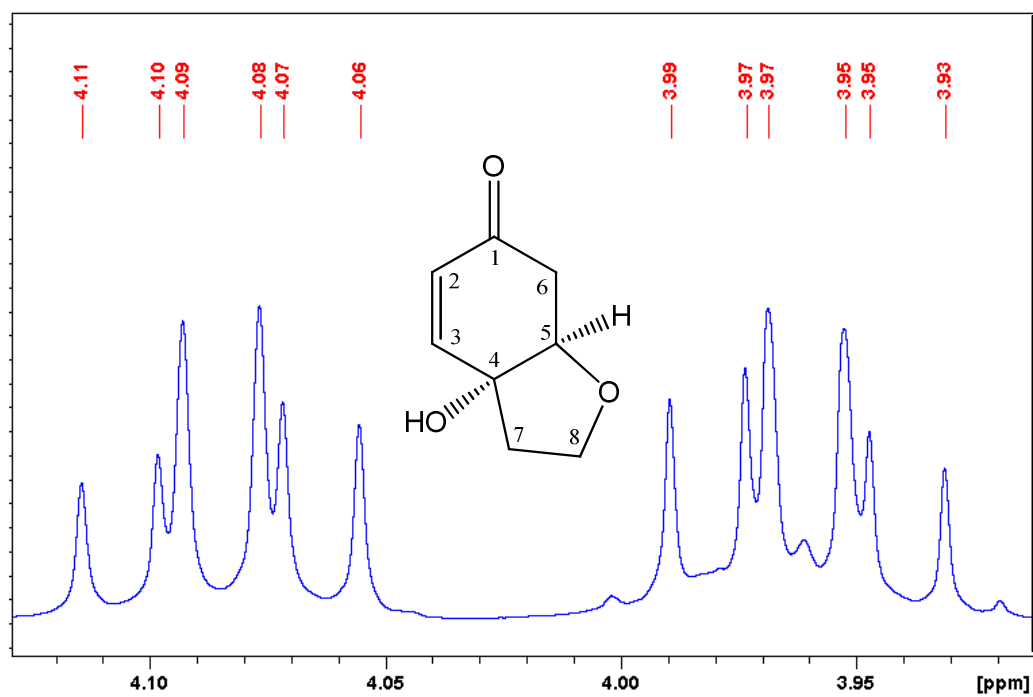


**E81** – Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **16** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

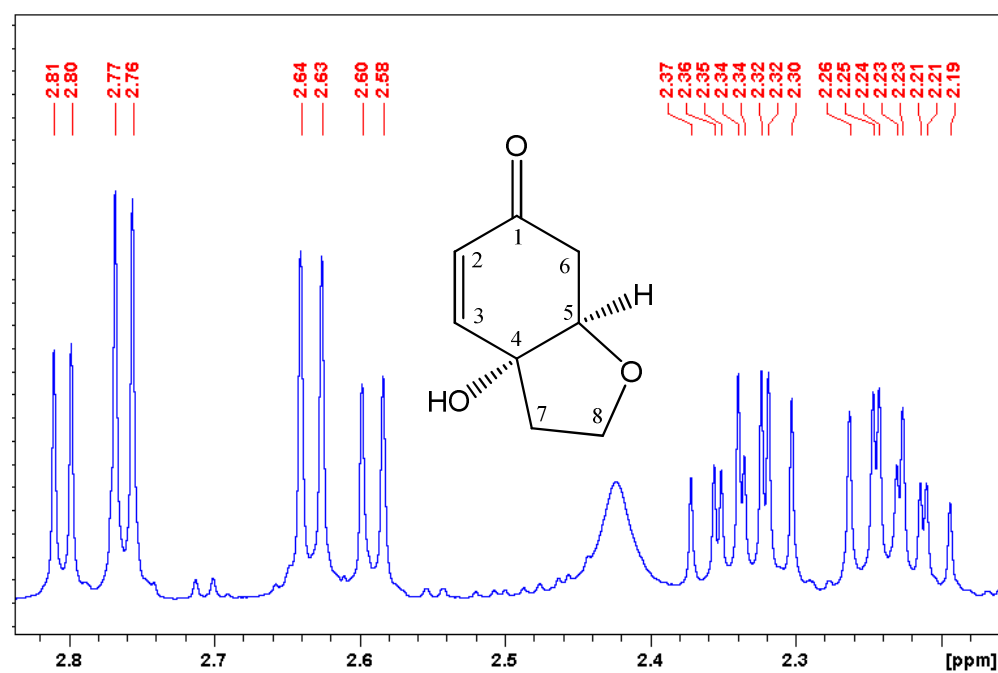




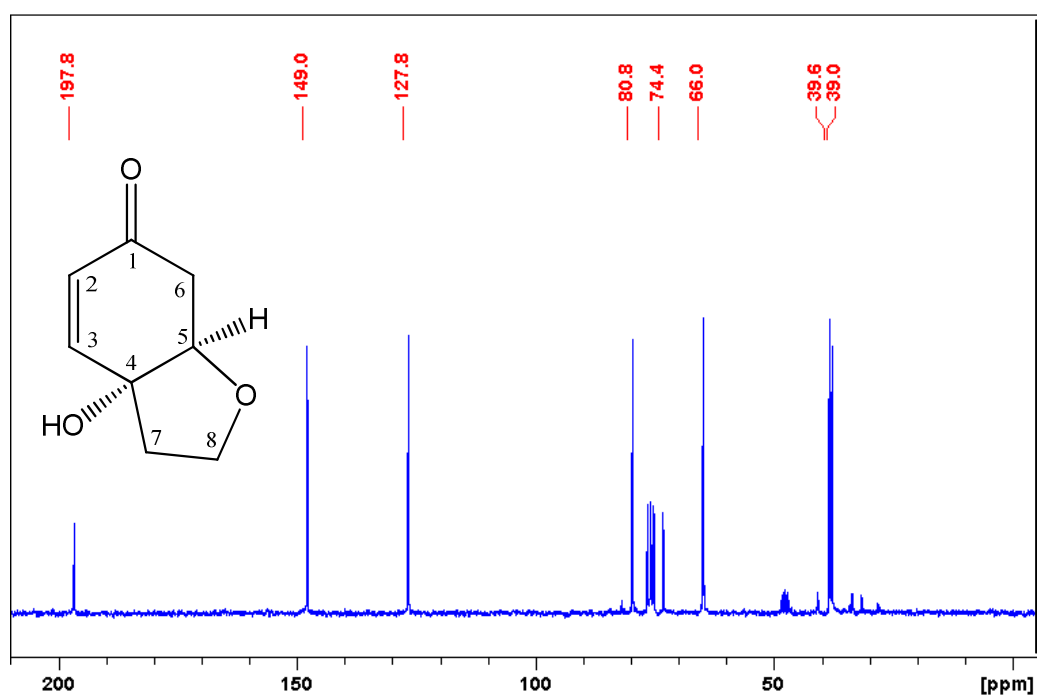
**E82** – Ampliação da região do hidrogênio oximetínico do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **16** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



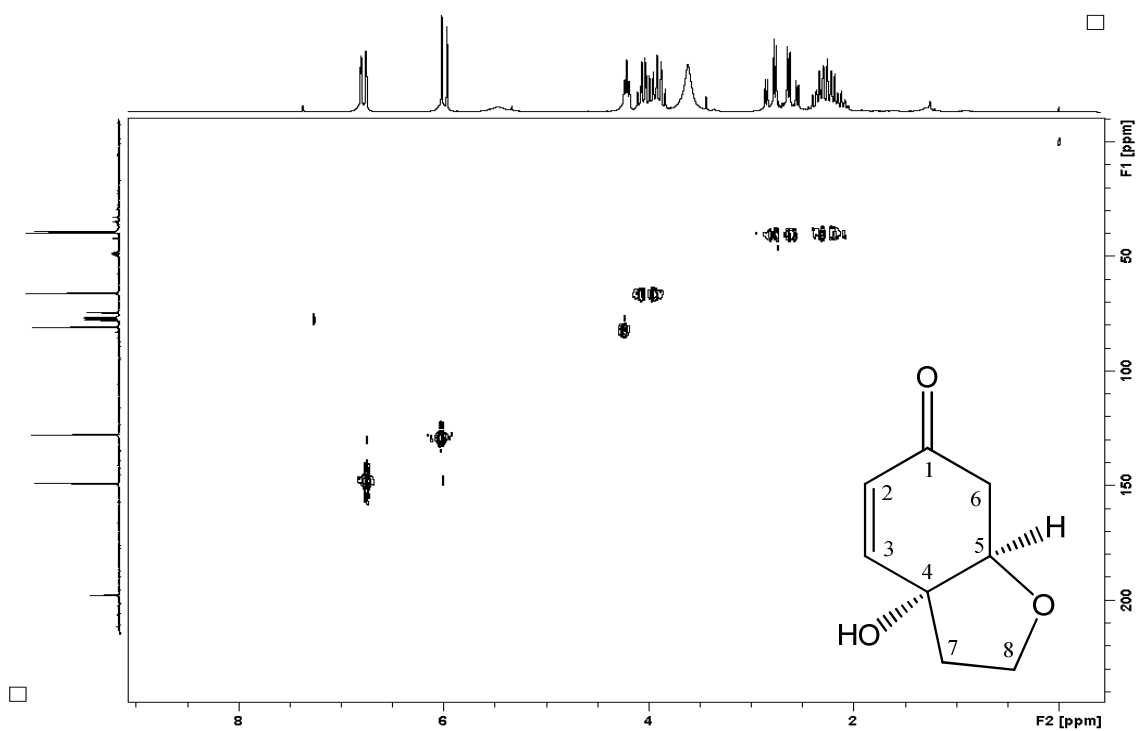
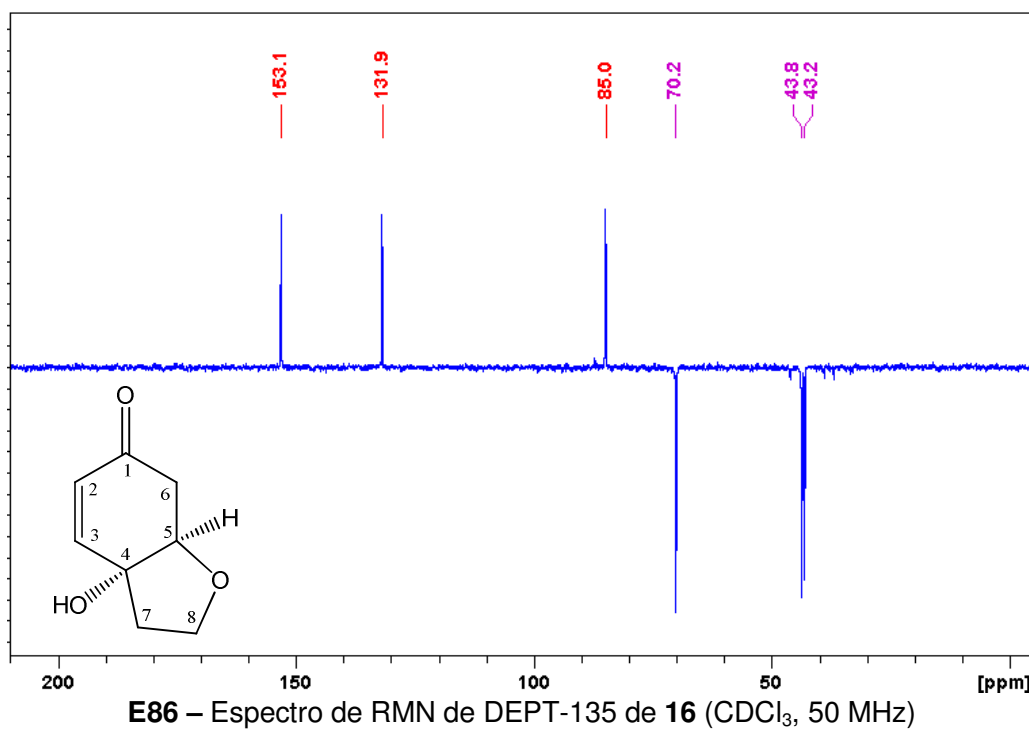
**E83** – Ampliação da região dos hidrogênios carbinólicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **16** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

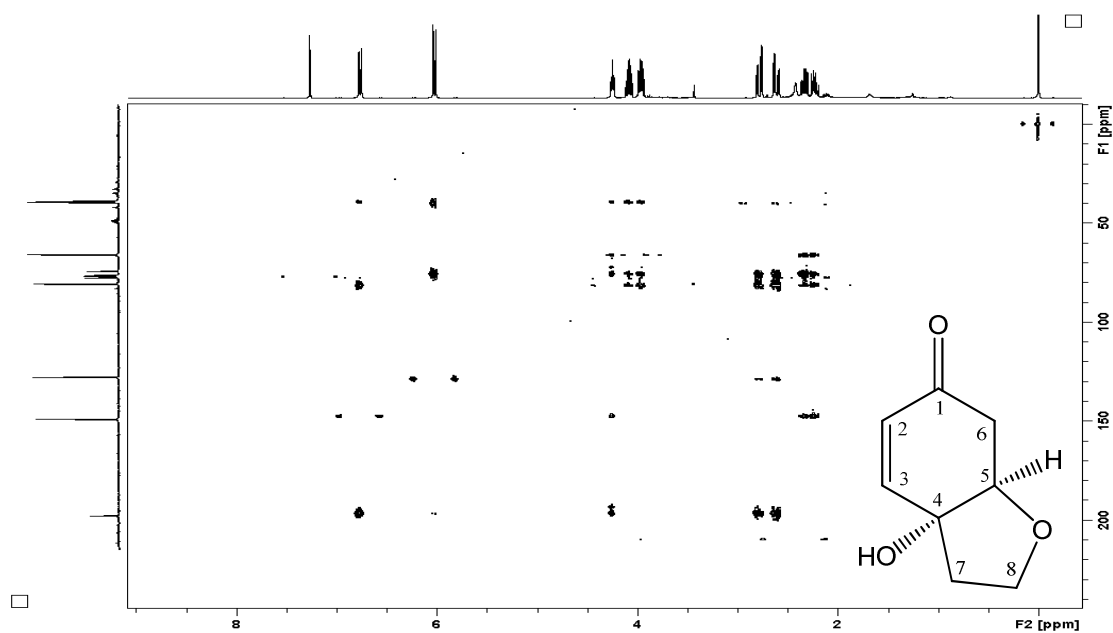


**E84** – Ampliação da região dos hidrogênios metilênicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **16** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

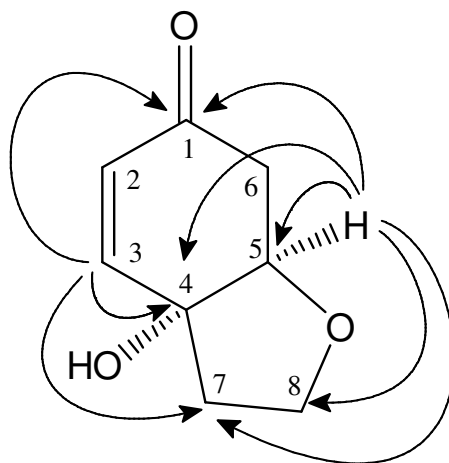


**E85** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  de **16** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)





**E88** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **16** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**Figura 20** – Principais correlações observadas no Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **16**

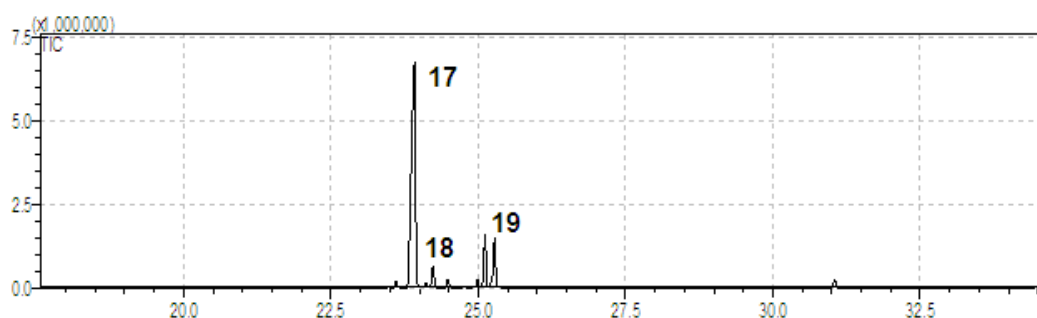
**Tabela 18** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$  de **16** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$
1	-	197,8	-
2	6,02 (1H, <i>d</i> , 10,2)	127,8	1, 2, 3
3	6,77 (1H, <i>dd</i> , 10,2; 1,4)	149,0	1, 4, 7
4	-	74,4	-
5	4,24 (1H, <i>ddd</i> , 5,8; 4,7; 1,4)	80,8	1, 4, 5, 7, 8
6a	2,61 (1H, <i>dd</i> , 16,8; 5,8)	39,6	1, 3, 4, 6
6b	2,77 (1H, <i>dd</i> , 16,8; 4,7)		1, 3, 4, 6
7a	2,22 (1H, <i>ddd</i> , 13,1; 8,1; 6,6)	39,0	3, 4, 5, 8
7b	2,33 (1H, <i>ddd</i> , 13,1; 8,3; 6,4)		3, 4, 5, 8
8a	3,95 (1H, <i>ddd</i> , 8,6; 8,1; 6,4)	66,0	3, 4, 7
8b	4,08 (1H, <i>ddd</i> , 8,6; 8,3; 6,6)		3, 4, 7

### 3.2.6. Identificação de 17, 18 e 19 – Sesquiterpenos

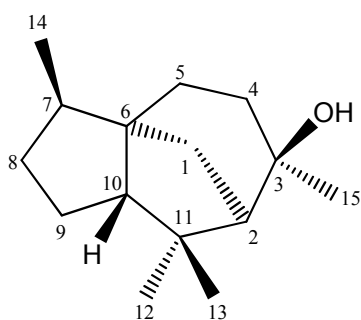
As substâncias **17**, **18** e **19** foram isoladas juntas, como um sólido incolor, que apresentou uma única mancha na análise por CCDA. No seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E89 – página 102) foram observados sinais correspondentes a 4 grupos metila ( $\delta$  0,84, 1,0, 1,26 e 1,32) (E90 – página 102) e a vários hidrogênios metilênicos e metínicos ( $\delta$  0,82 - 1,89) (E91 – página 103). Alguns sinais fracos nas regiões de 3,90-4,19 ppm e 5,11-5,46 ppm foram atribuídos a impurezas, uma vez que a integração mostrava uma relação de 0,3:1,0 desses sinais em relação a um grupo metila. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado ( $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ) (E92 – página 103) confirmou a presença de uma substância principal acompanhada de impurezas, pois mostrou 15 sinais mais intensos acompanhados de sinais mais fracos. Os sinais mais intensos foram utilizados para a identificação do constituinte principal. A combinação dos espectros  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  e DEPT (E93 – página 104) mostrou a presença de 4 grupos metila ( $\delta$  15,6, 27,6, 28,9 e 30,2), 5 grupos metileno ( $\delta$  25,4, 31,6, 35,4, 37,0 e 42,0), três grupos metínicos ( $\delta$  41,5, 56,5 e 61,0) e 3 carbonos quaternários, sendo um deles oxigenado ( $\delta$  43,4, 54,1, 75,1). Esses dados indicam a fórmula  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ , compatível com 3 graus de insaturação. Como não há carbonos olefínicos, a substância deve ser tricíclica. A análise dos espectros HSQC e HMBC (E94-95 – páginas 104-105), mostrou que os grupos metila em  $\delta$  1,00 e 1,26 estavam ligados ao carbono em  $\delta$  43,4 e

apresentavam correlação com o carbono metínico em  $\delta$  61,0 (Tabela 19 – página 105). Analisando detalhadamente esses espectros bidimensionais e comparando com dados publicados (BARRERO *et al.*, 2000; BROWN *et al.*, 2003) pode-se identificar o componente majoritário da mistura como o sesquiterpeno cedrol (**17**). Com o objetivo de tentar identificar os constituintes minoritários, esta amostra foi analisada por CG-DIC e CG-EM. De acordo com o esperado, o cromatograma mostrou um componente majoritário (TR = 23,916'; 80,3% do total) e vários picos menores (Figura 21 – página 101).

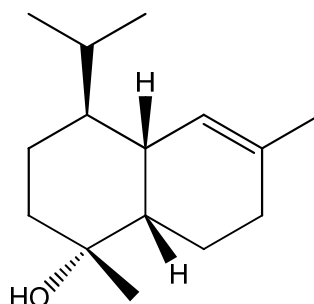


**Figura 21** – Cromatograma de **17**, **18** e **19**

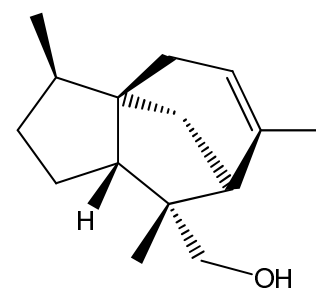
O índice de retenção (IR) da substância majoritária foi 1604, compatível com o valor registrado para o cedrol (1600, ADAMS, 2007). Entre os constituintes minoritários, foram identificados por comparação de seus índices de retenção e espectros de massa com a literatura (ADAMS, 2007), os sesquiterpenos  $\alpha$ -muurolol (**18**; TR = 24,484'; IR = 1644; lit. = 1644; 1,8%) e 8-cedren-13-ol (**19**; TR = 25,276'; IR = 1688; lit = 1688; 5,6%).



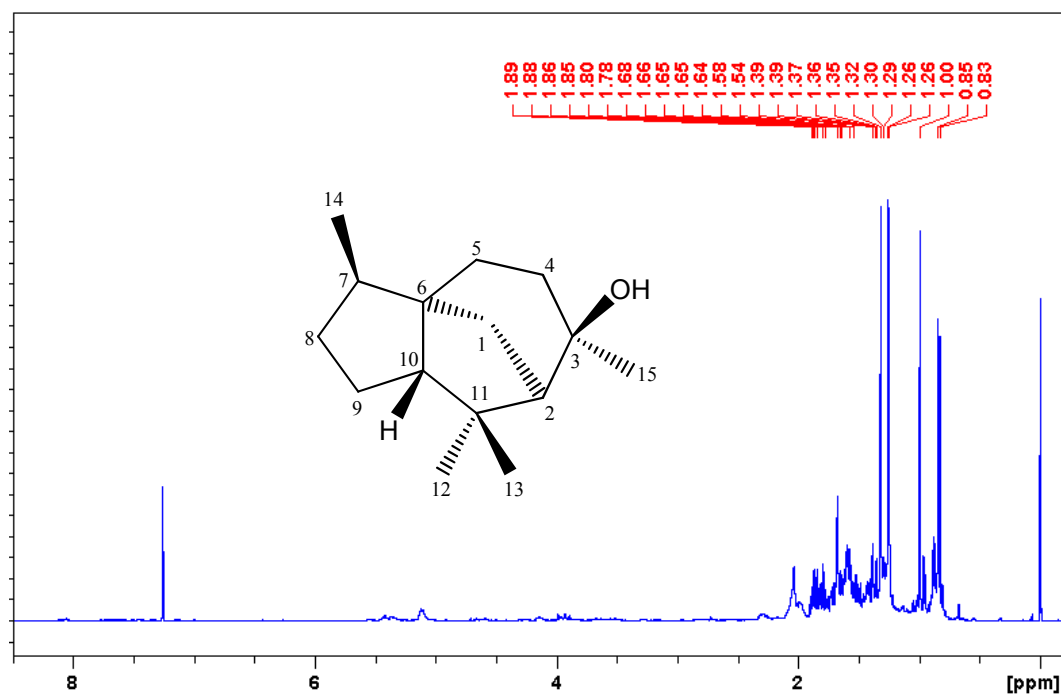
**17**



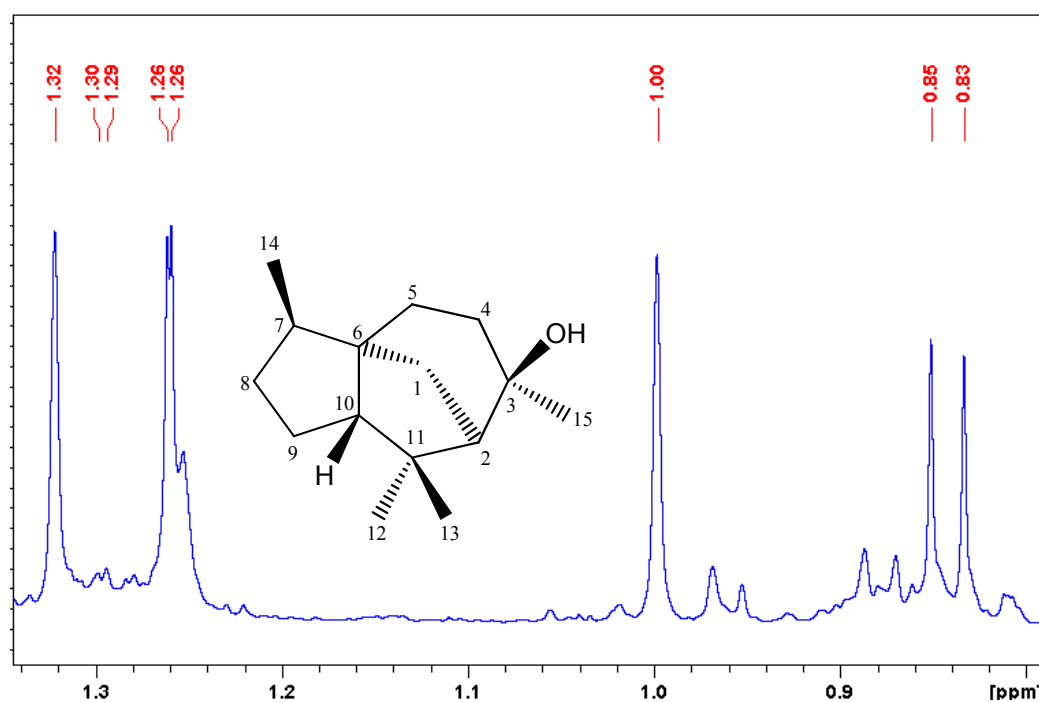
**18**



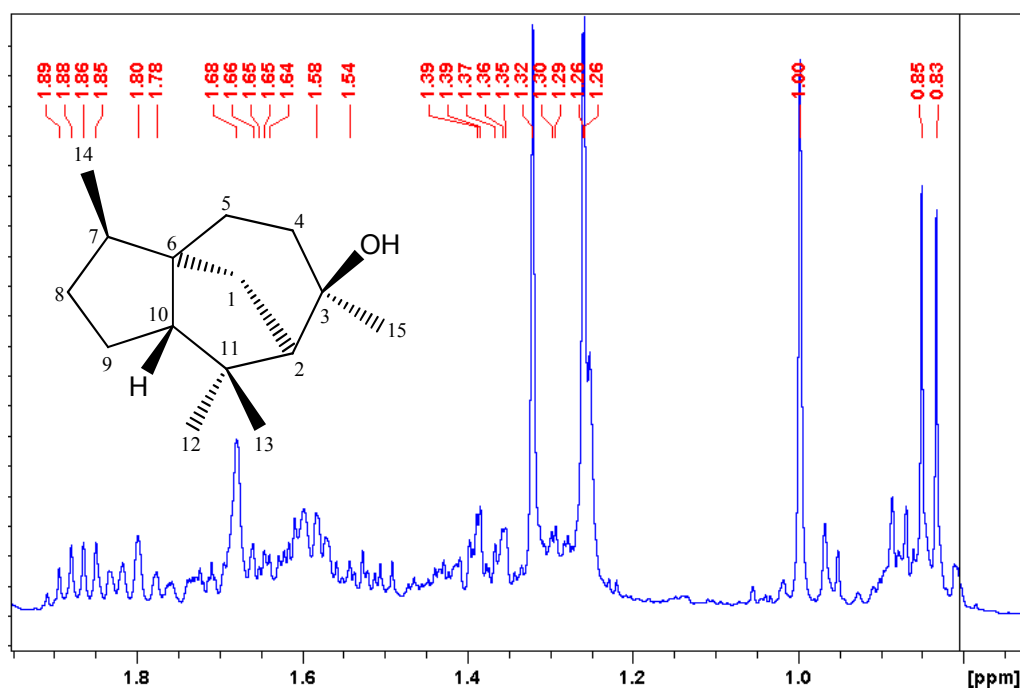
**19**



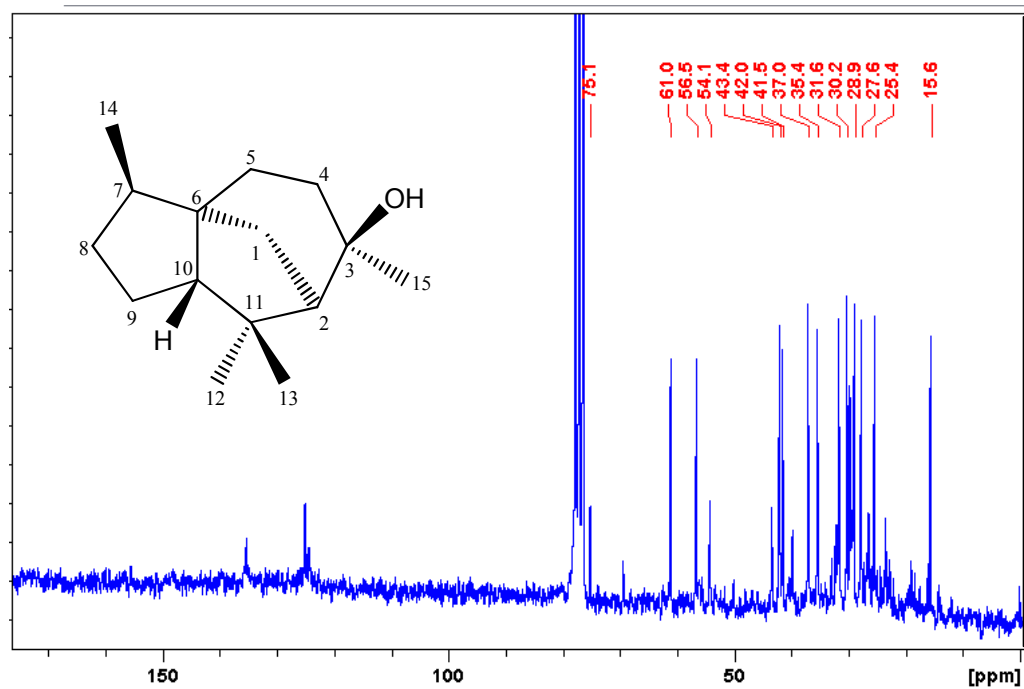
**E89** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **17**, **18** e **19** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E90** – Ampliação da região dos hidrogênios metílicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **17**, **18** e **19** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

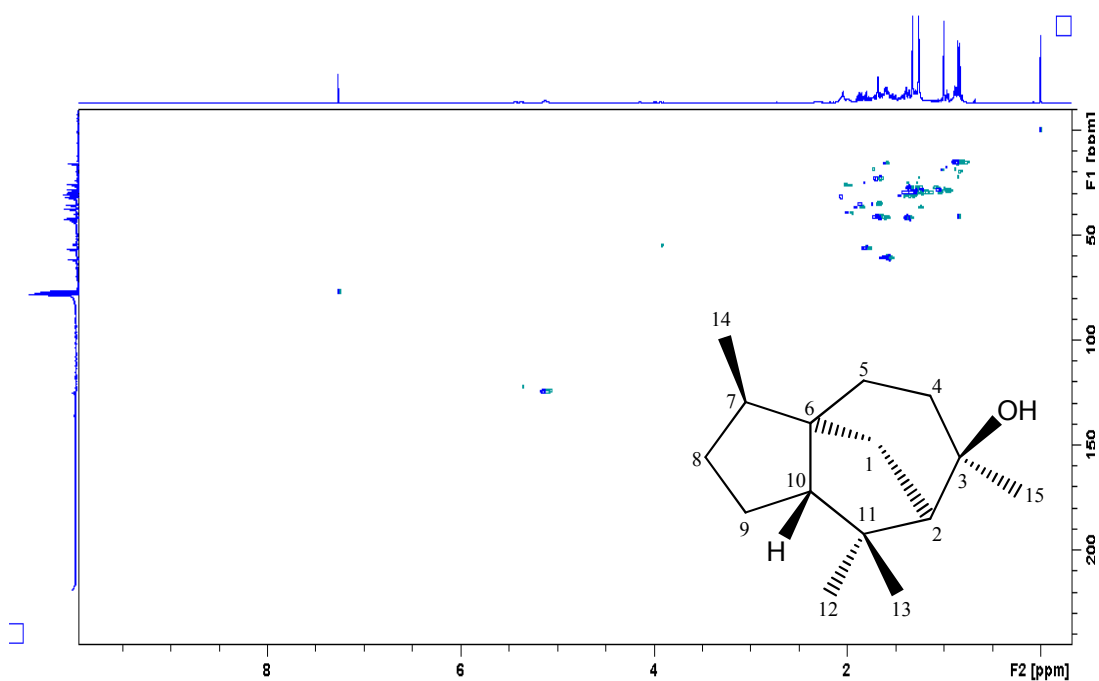
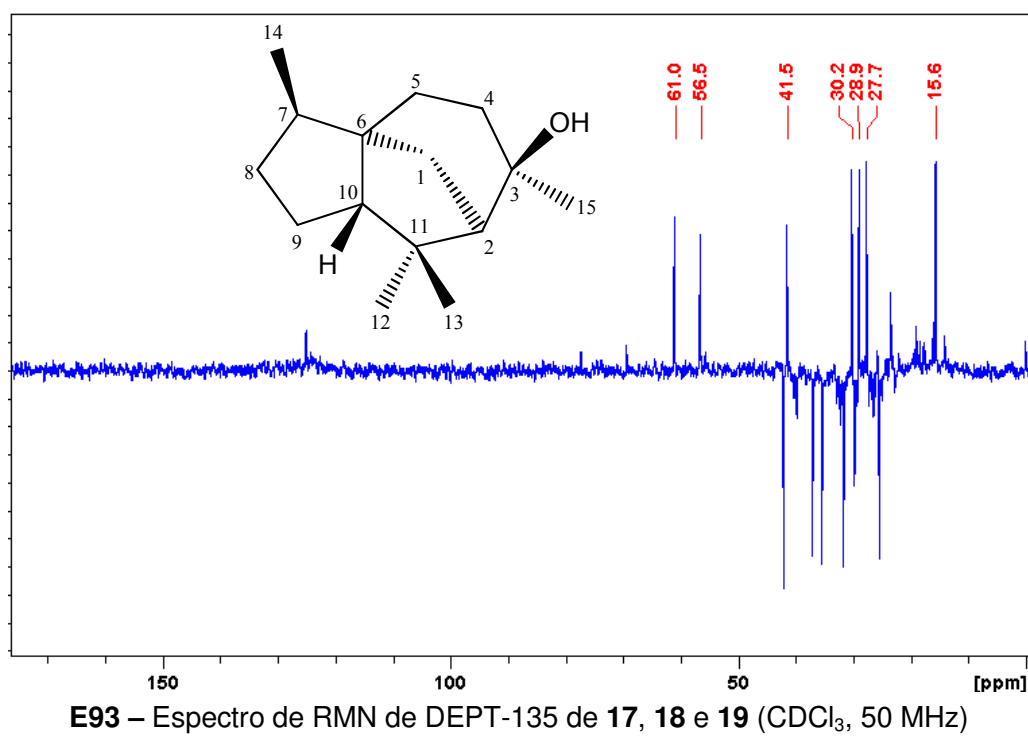


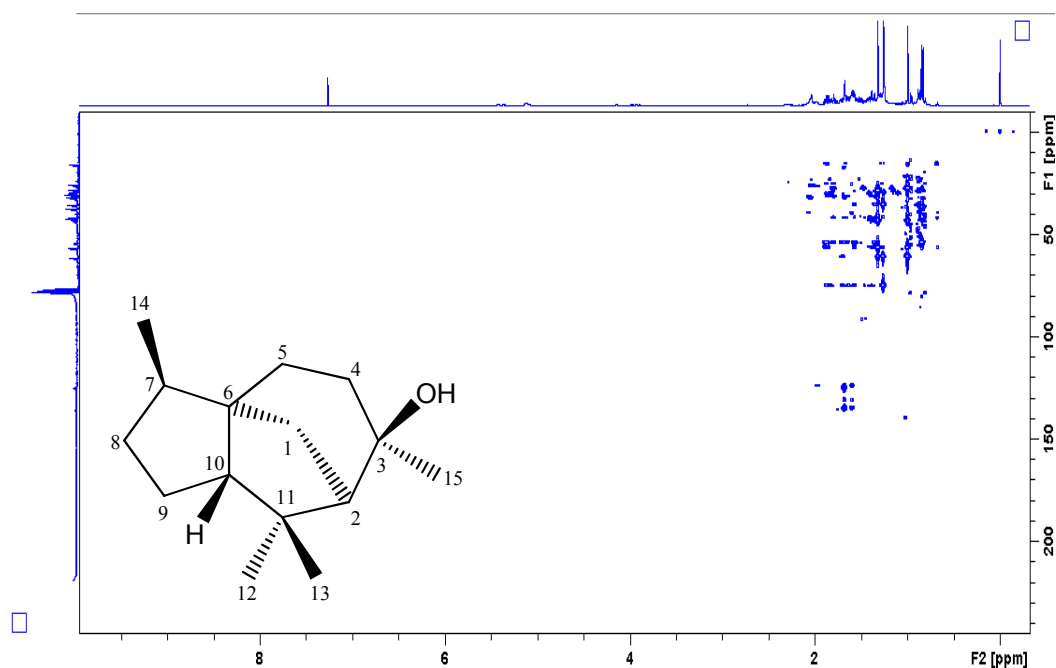
**E91** – Ampliação da região dos hidrogênios metilênicos e metínicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **17**, **18** e **19** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E92** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  de **17**, **18** e **19** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)







**E95** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **17**, **18** e **19** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

**Tabela 19** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) de **17**

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$^{\text{CD}}J_{\text{H,C}}$
1	1,65; 1,36 ( <i>m</i> )	42,0	3
2	1,58 ( <i>m</i> )	61,1	3, 10
3	-	75,1	-
4	1,78 ( <i>m</i> )	35,4	5, 6
5	1,38 ( <i>m</i> )	31,6	10
6	-	54,1	-
7	1,69 ( <i>m</i> )	41,5	6
8	1,88; 1,29 ( <i>m</i> )	37,0	6, 10
9	1,54; 1,37 ( <i>m</i> )	25,4	10, 11
10	1,80 ( <i>m</i> )	56,6	5, 7, 13
11	-	43,4	-
12	1,00 ( <i>s</i> )	28,9	2, 10, 11, 13
13	1,32 ( <i>s</i> )	27,7	2, 10, 11, 12
14	0,84 ( <i>d</i> , 7,0)	15,6	6, 7, 8
15	1,26 ( <i>d</i> , 0,9)	30,2	2, 3, 4

### 3.2.7. Identificação de 20, 21, 22 e 23 – Esteróides

A mistura de **20**, **21**, **22** e **23** foi isolada como agulhas incolores. O seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (E96 – página 108) apresentou sinais intensos na região de  $\delta$  0,60-2,20, característicos dos grupos metílicos e metilênicos de esteroides (E97 – página 108), sinal de um hidrogênio oximetínico em  $\delta$  4,61 (*m*, H-3) (E98 – página 109), e sinais de hidrogênios olefínicos em  $\delta$  5,35 (*m*) e em  $\delta$  5,01 e 5,15 (*dd*, 15,1; 8,6 Hz) (E99 – página 109). Estes dados sugeriram a presença de uma mistura de esteróides, com os esqueletos do sitosterol e estigmasterol (MACARI *et al.*, 1990). O deslocamento químico do hidrogênio oximetínico em  $\delta$  4,61, e não em  $\delta$  3,51 indicou esterificação da hidroxila. A integração dos sinais dos hidrogênios olefínicos e oximetínico informou que a substância com esqueleto do sitosterol era majoritária, representando 90% da mistura.

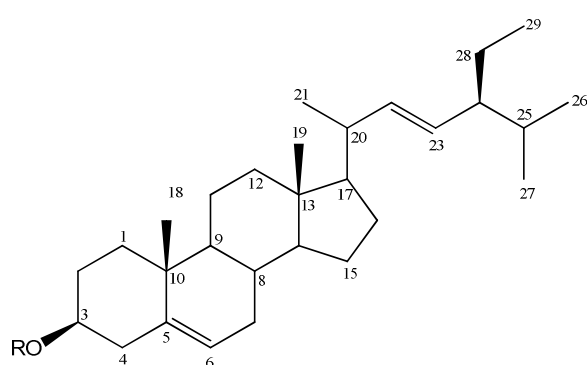
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  (E100 – página 110) apresentou 32 sinais intensos na região entre 11,9 e 56,7 ppm, correspondentes a grupos metílicos, metilênicos e metínicos. Além destes, foram observados um carbono oxigenado em  $\delta$  73,7, quatro carbonos olefínicos em  $\delta$  122,6; 129,8; 130,0 e 139,7 (E101 – página 110), e um carbono em  $\delta$  173,3, típico de uma carbonila de éster. Os sinais em  $\delta$  122,6 e 139,7 podem ser atribuídos aos carbonos 5 e 6 do esqueleto do sitosterol, que é majoritário na mistura. Os picos em  $\delta$  129,8 e 130,0 são característicos de ligação dupla em uma cadeia alifática. Portanto podemos concluir que o componente majoritário é um éster do sitosterol com um ácido alifático monoinsaturado. A esterificação foi confirmada pelo mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância (HMBC) (E104 – página 112), no qual o hidrogênio H-3 apresentou correlação com a carbonila ( $\delta$  173,3) (Tabelas 20-21 – página 113).

Além dos sinais intensos já citados, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  também mostrou seis picos fracos na região dos carbonos olefínicos:  $\delta$  127,9; 128,0; 129,2; 130,1; 130,2 e 138,3. Através do espectro DEPT-135 (E102 – página 111) foi determinado que esses picos pertenciam a carbonos metínicos. Os sinais em  $\delta$  138,3 e 129,2 correspondem aos carbonos 22 e 23 do esqueleto do estigmasterol. Os demais devem pertencer a uma cadeia alifática com duas insaturações.

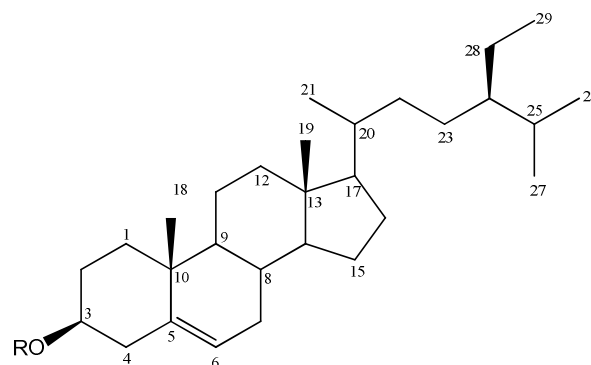
Na natureza ocorrem vários ácidos de cadeia longa, saturados e insaturados. Os saturados mais comuns são os ácidos mirístico ( $\text{C}_{14}$ ), palmítico ( $\text{C}_{16}$ ) e esteárico ( $\text{C}_{18}$ ). Entre os insaturados mais comuns encontram-se os ácidos oléico ( $\text{C}_{18}$ ,  $\Delta^9$ ), linoleico ( $\text{C}_{18}$ ,  $\Delta^{9,12}$ ) e linolênico ( $\text{C}_{18}$ ,  $\Delta^{9,12,15}$ ). Com o objetivo de determinar o tamanho da cadeia carbônica do ácido, foi obtido o espectro de massas de alta resolução (E105 – página 112) pela técnica de *spray* de elétrons (modo positivo), que fornece a massa do íon molecular. Este espectro

mostrou picos em:  $m/z$  675,60674, compatível com  $C_{47}H_{79}O_2$ , que pode ser atribuído ao estigmasterol esterificado com ácido linoleico (**22**) e em  $m/z$  679,49115, compatível com  $C_{47}H_{83}O_2$ , que pode ser atribuído ao sitosterol esterificado com ácido oleico (**20**), o componente principal da mistura. Também pode ser observado um pico em  $m/z$  677,47534 ( $C_{47}H_{81}O_2$ ) que pode ser decorrente da esterificação do sitosterol com ácido linoléico (**21**) ou do estigmasterol com ácido oleico (**23**). Os demais picos devem ser correspondente aos picos de moléculas contendo isótopos mais pesados ( $^{13}C$ ).

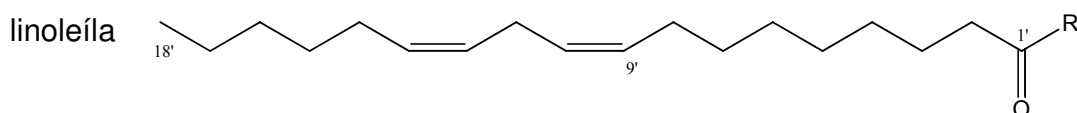
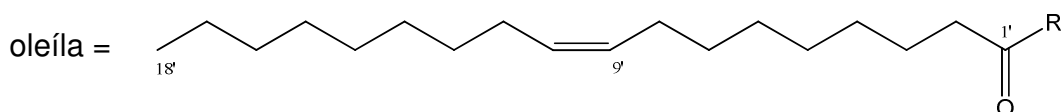
Portanto, a análise destes dados, bem como as correlações observadas nos espectros de HSQC (E103 – página 111) e HMBC (E104 – página 112) e a comparação com a literatura (CHAVES *et al.*, 2010; SHIMADA *et al.*, 1999), mostrou que esta mistura contém ao menos 4 substâncias oleato de sitosterila (**20**, principal), linoleato de sitosterila (**21**), oleato de estigmasterila (**22**) e linoleato de estigmasterila (**23**).

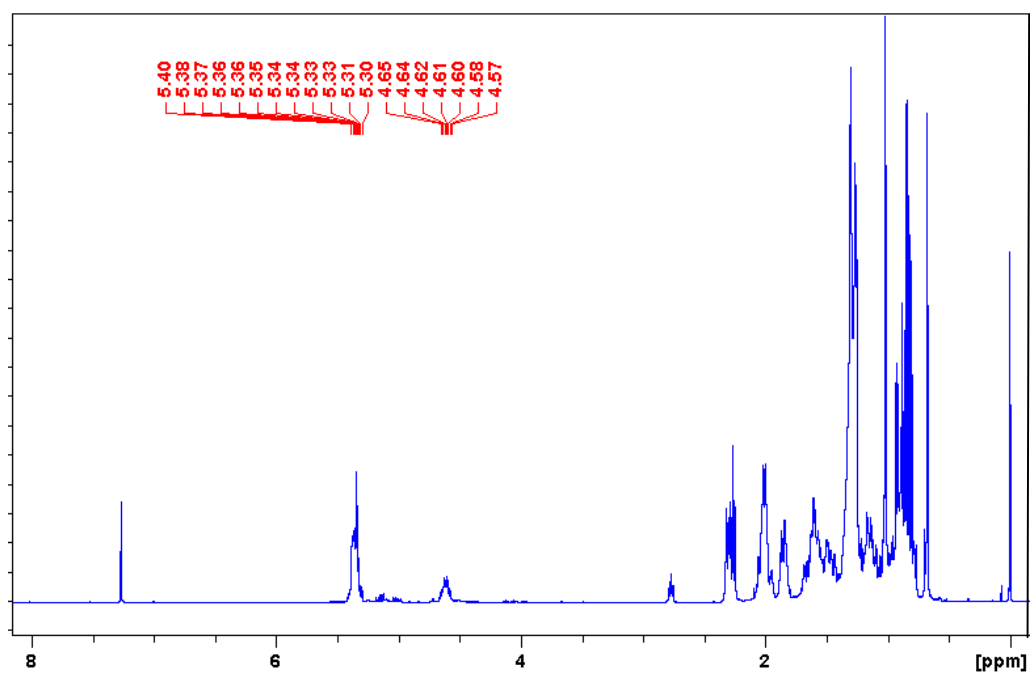


**20** – R = oleíla  
**21** – R = linoleíla

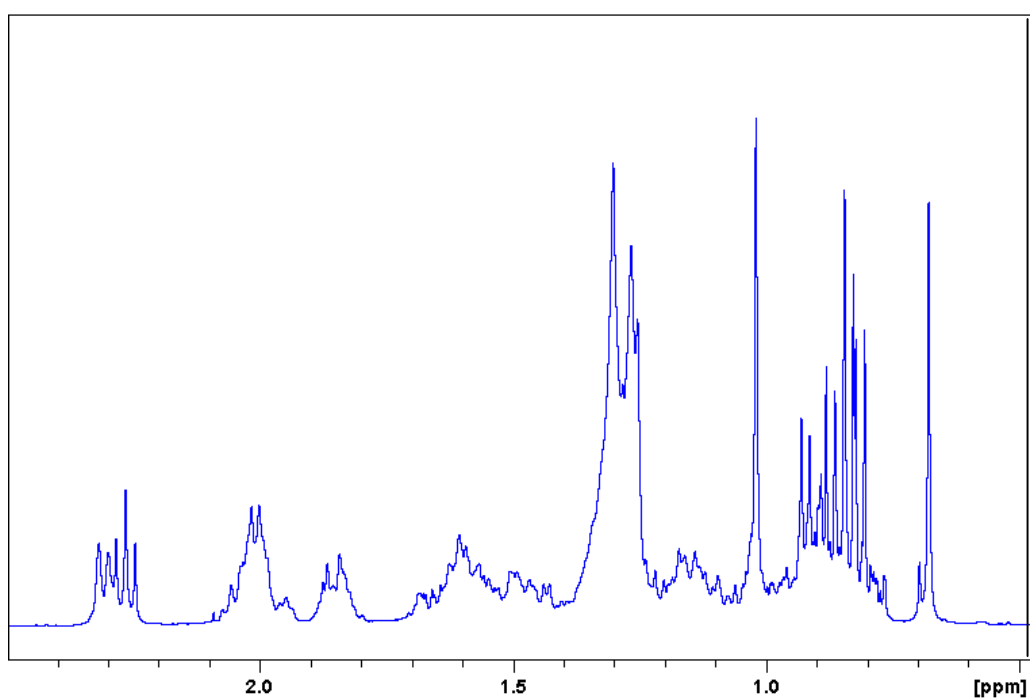


**22** – R = oleíla  
**23** – R = linoleíla

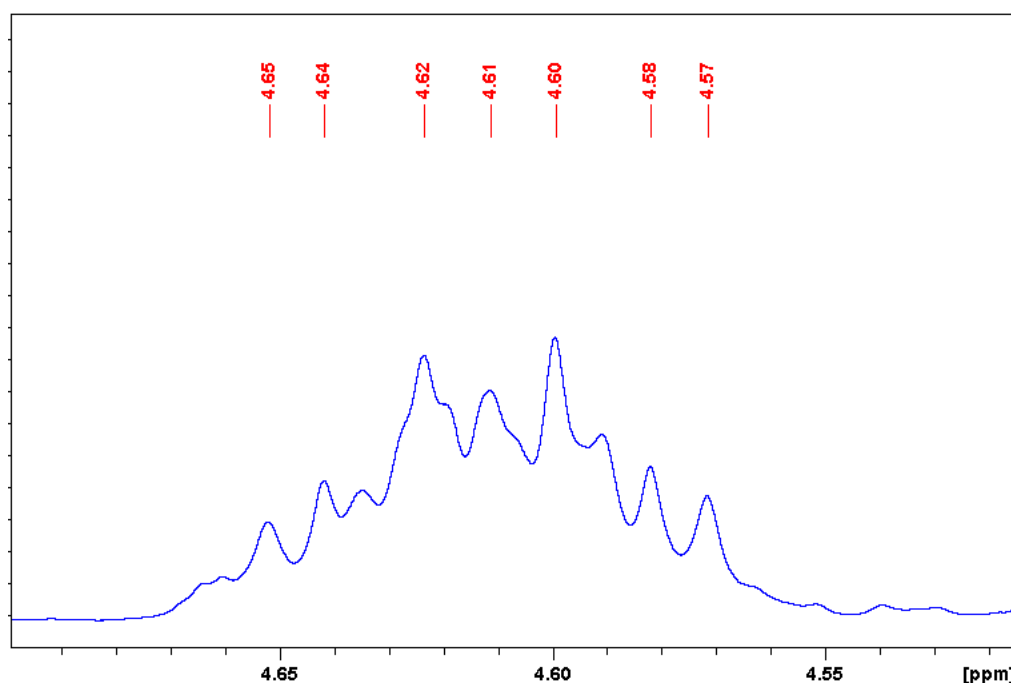




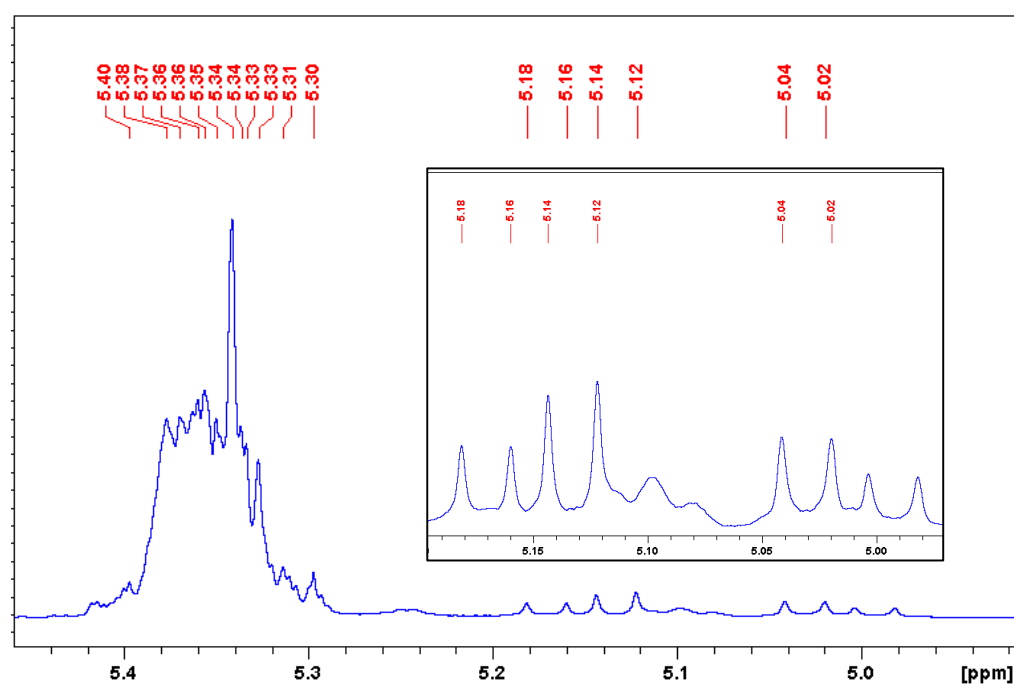
**E96** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **20**, **21**, **22** e **23** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



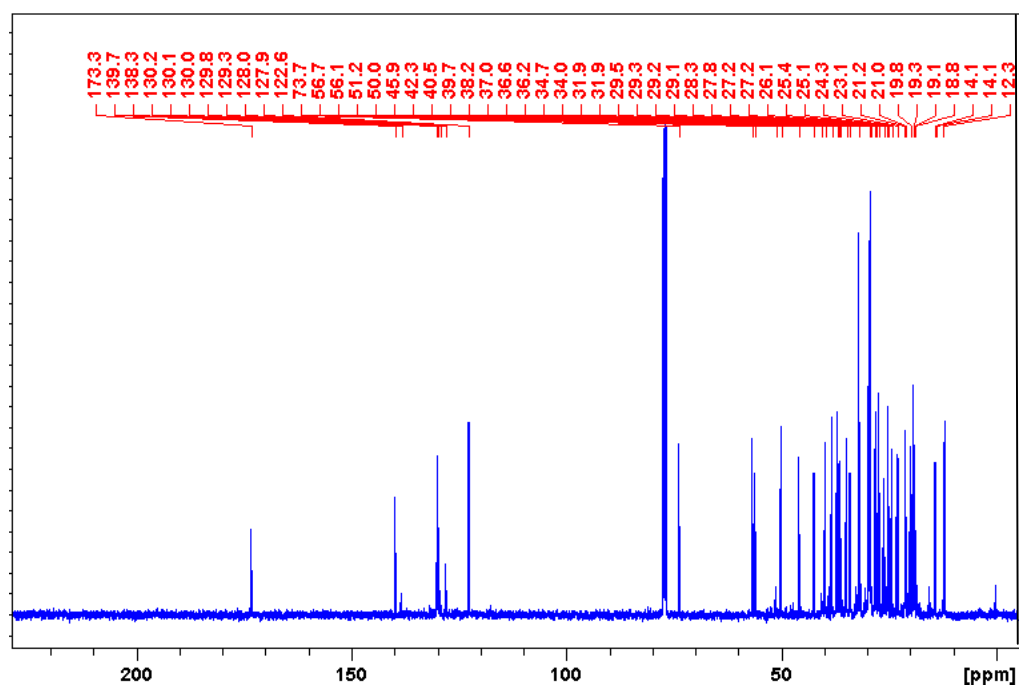
**E97** – Ampliação da região dos hidrogênios metílicos e metilênicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **20**, **21**, **22** e **23** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



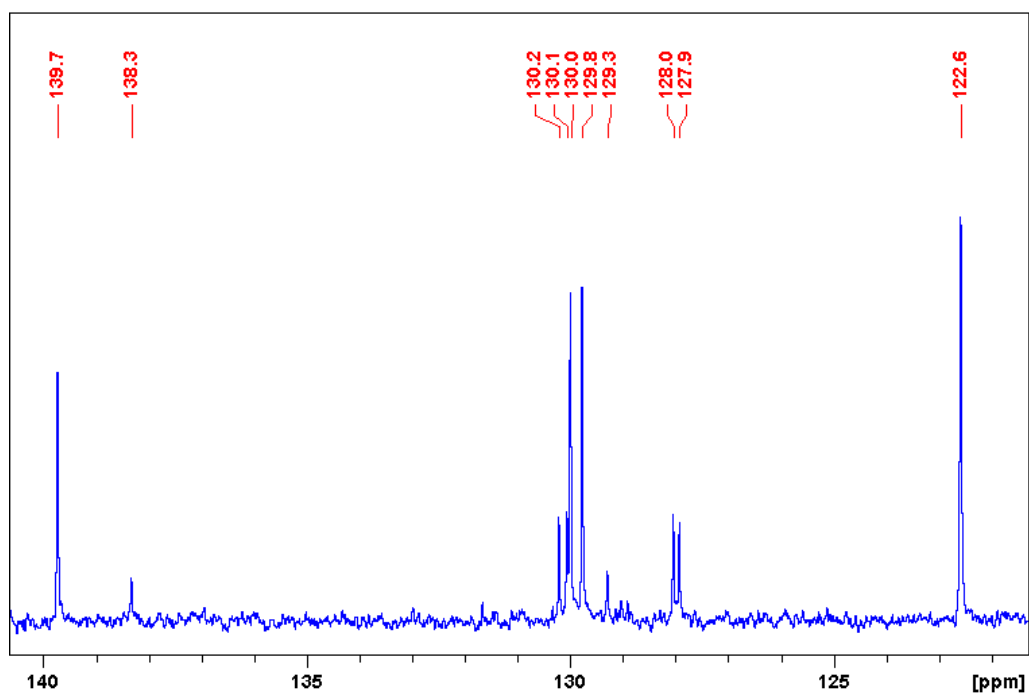
**E98** – Ampliação da região do hidrogênio oximetínico do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **20**, **21**, **22** e **23** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



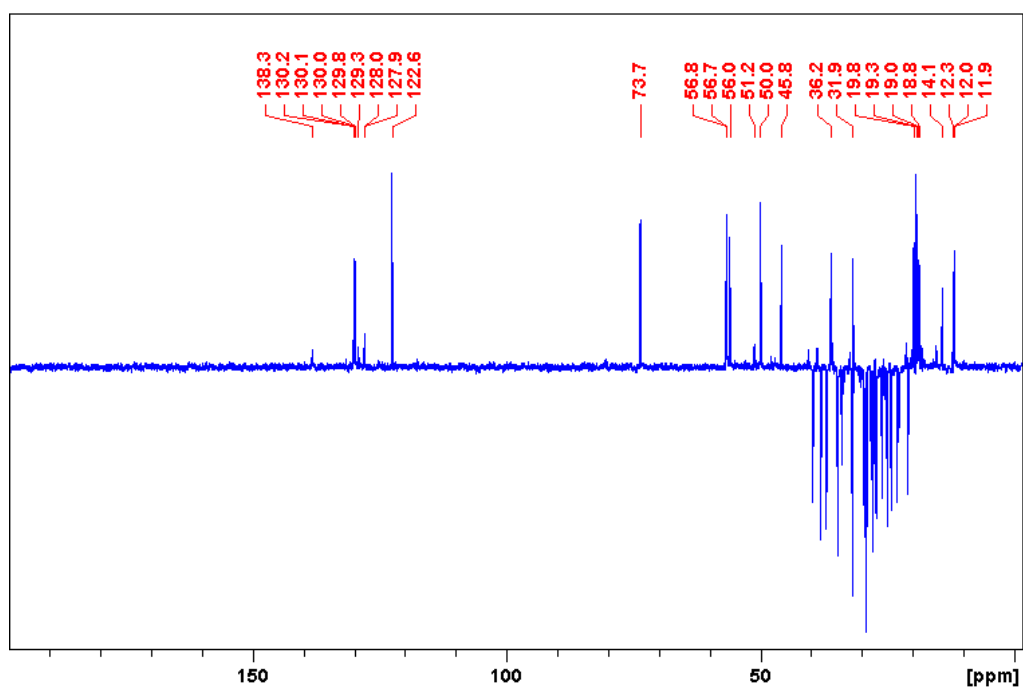
**E99** – Ampliação da região dos hidrogênios olefínicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **20**, **21**, **22** e **23** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



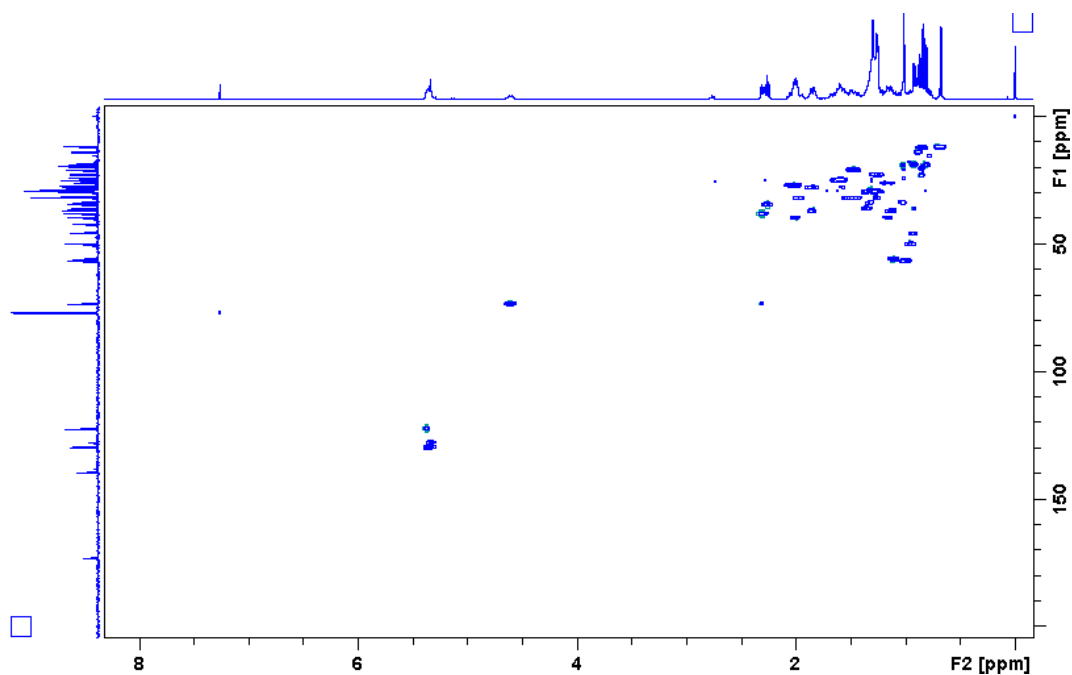
**E100** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  de **20**, **21**, **22** e **23** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)



**E101** – Ampliação da região dos carbonos olefínicos do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  de **20**, **21**, **22** e **23** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)

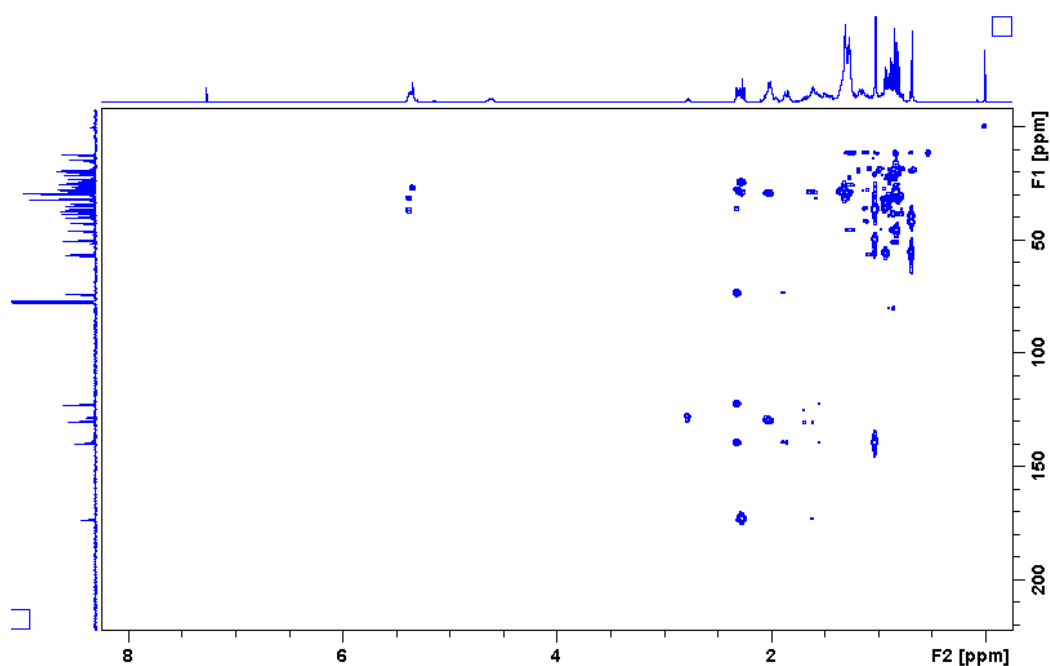


**E102** – Espectro de RMN de DEPT-135 de **20**, **21**, **22** e **23** (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)

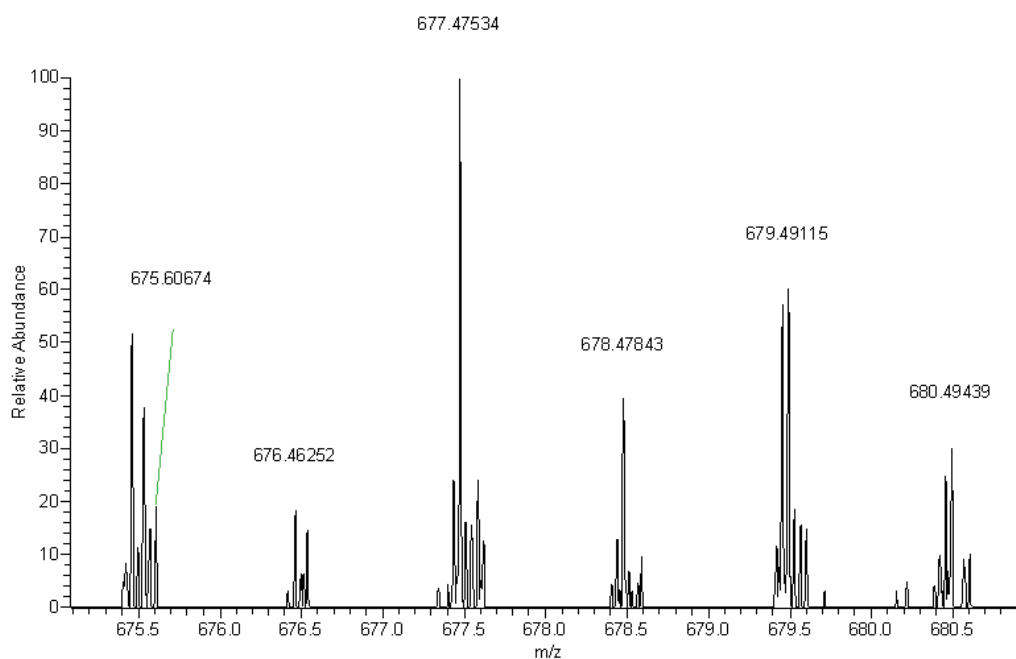


**E103** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação de **20**, **21**, **22** e **23** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)





**E104** – Mapa de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância de **20**, **21**, **22** e **23** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



**E105** – Espectro de massas de alta resolução das substâncias **20**, **21**, **22** e **23**

**Tabela 20** – Principais dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **20** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

Posição	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$	Posição	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$^{\text{LD}}J_{\text{H,C}}$
3	4,60 (m)	2, 1'	26	0,81 (d; 7,0)	24, 25, 27
4	2,30 (dl; 7,5)	2, 3, 5, 6, 10	27	0,84 (d; 7,0)	25, 26, 27
6	5,36 (m)	8, 10	29	0,84 (t; 7,0)	
18	0,68 (s)	12, 13, 14, 17	2'	2,26 (t; 7,5)	1', 3', 4'
19	1,01 (s)	1, 5, 10	9' e 10'	5,33 (m)	8', 11'
21	0,92 (d; 6,6)	17, 20, 22	18'	0,88 (t; 6,6)	16', 17'

**Tabela 21** – Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **20** e **22** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)

Posição	SAL-4a	SAL-4c	Posição	SAL-4a	SAL-4c
1	37,0	37,0	23	39,7	129,2
2	27,8	27,8	24	45,8	51,2
3	73,7	73,7	25	26,1	31,9
4	38,2	38,2	26	19,0	19,0
5	139,7	139,7	27	19,8	19,0
6	122,6	122,6	28	23,1	25,4
7	31,9	31,9	29	12,0	12,3
8	31,9	31,9	1'	173,3	173,3
9	50,1	50,1	2'	34,7	34,7
10	36,6	36,6	3'	29,1	29,1
11	21,0	21,0	4'	25,1	25,1
12	39,7	39,7	5', 6', 7'	29,2*	29,2*
13	42,3	42,3	8'	27,2	27,2*
14	56,7	56,8	9'	129,8	128,0*
15	24,3	24,4	10'	130,0	130,1*
16	28,2	28,2	11'	27,2	N.O
17	56,1	55,9	12'	29,4*	127,9*
18	11,9	11,9	13'	29,4*	130,2*
19	19,3	19,3	14'	29,2*	27,2
20	36,2	40,5	15', 16', 17'	29,2*	29,2*
21	18,8	21,2	18'	14,2	14,1
22	34,0	138,3	-	-	-

\* Valores que podem estar trocados; N.O – não observado. Atribuições baseadas nos espectros HSQC e HMBC e, em dados da literatura (CHAVES *et al.*, 2010)

## 4. BIOSÍNTESE

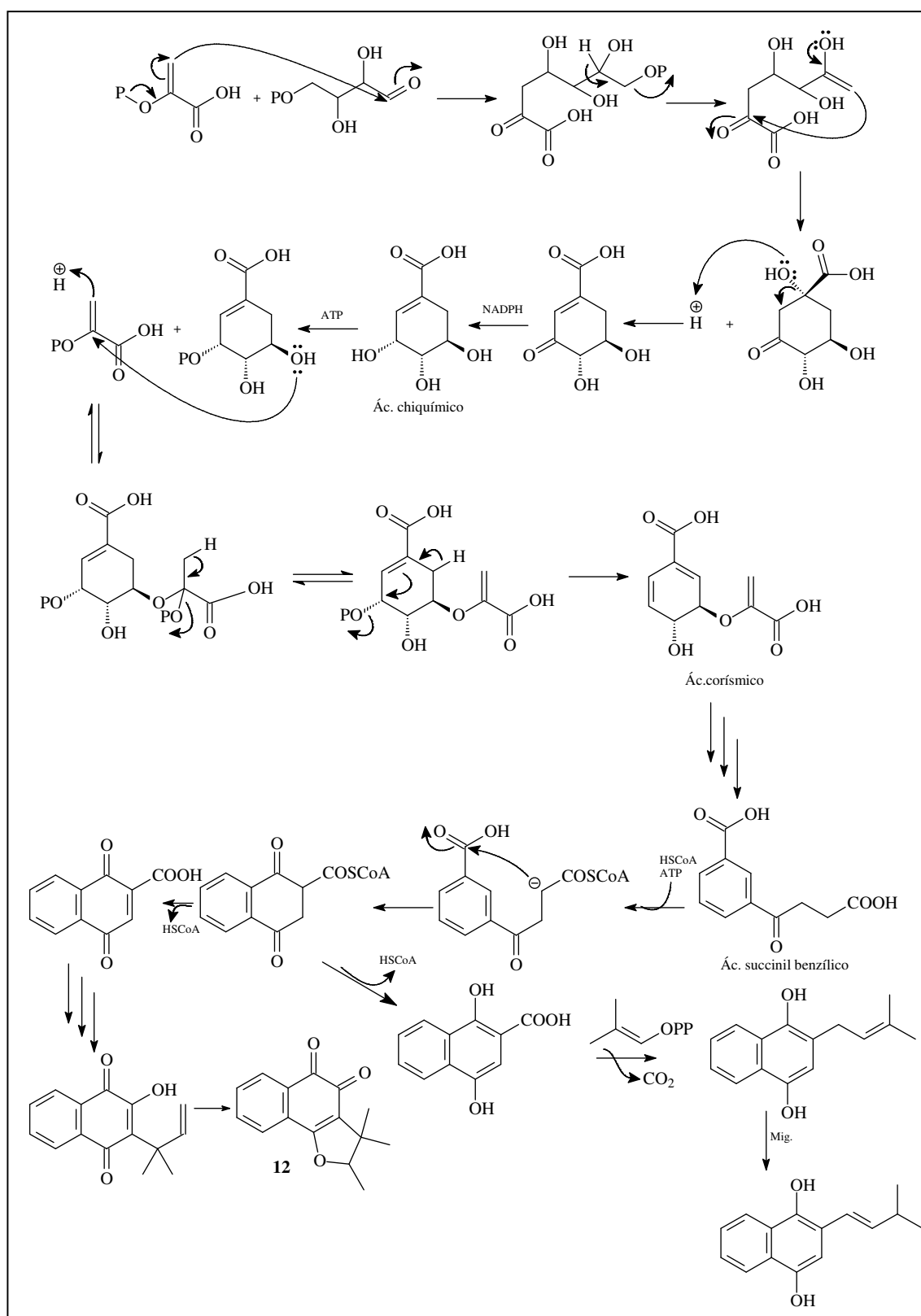
A biossíntese das substâncias inéditas isoladas foi proposta com base em estudos já realizados com precursores e outras substâncias isoladas da família.

### 4.1. Quinonas

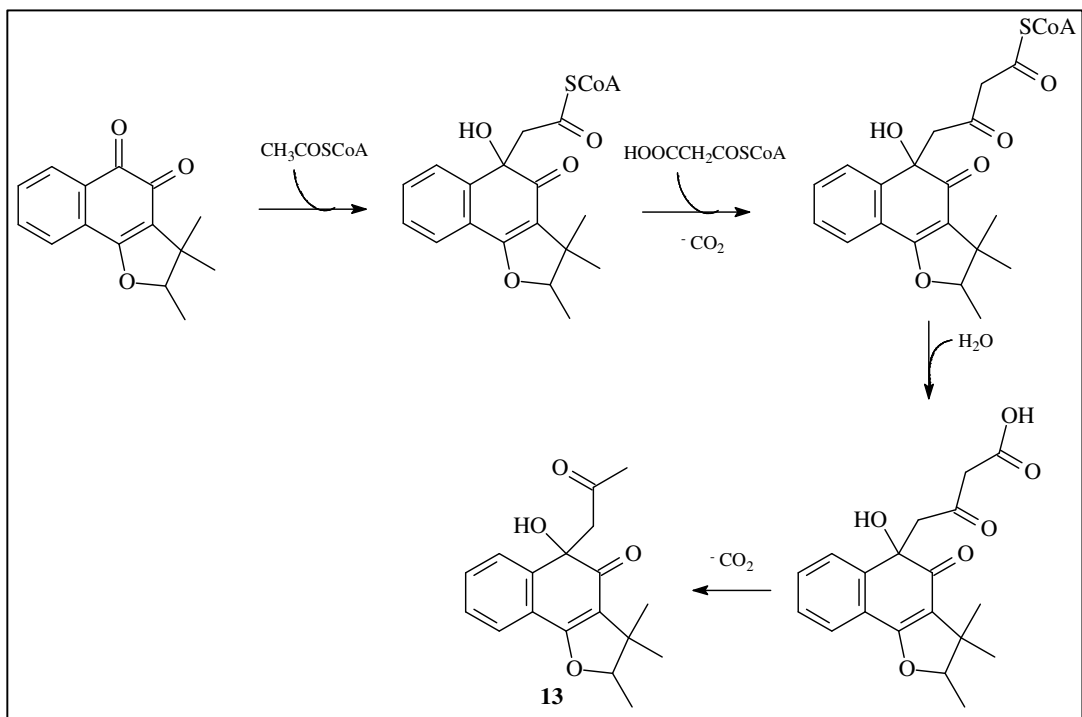
Quinonas são geralmente derivadas da oxidação de compostos fenólicos, catecois (1,2-diidroxibenzenos) dando origem a *orto*-quinonas e quinois (1,4-diidroxibenzenos) dando origem a *para*-quinonas. De uma forma geral, quinonas podem ser formadas de sistemas fenólicos, pela via do acetato ou do chiquimato. Uma variedade de derivados de quinonas e estruturas relacionadas contendo um fragmento terpenoide (via do mevalonato) bem como uma porção derivada do chiquimato, são também amplamente distribuídas (DEWICK, 2001). Esta é a situação das naftoquinonas isoladas de *Streptocarpus dunnii*, uma espécie de Gesneriaceae (INOUE *et al.*, 1984). De acordo com esses autores, o núcleo quinônico provém da via do chiquimato, passando pelo ácido 2-succinilbenzóico (Figura 22 – página 115). Baseado neste estudo foram propostas rotas biossintéticas para as substâncias novas **13**, **14** e **15**.

A proposta de biossíntese de **13** está representada na Figura 23 – página 116, onde primeiramente ocorre a adição de uma unidade de acetil-CoA à carbonila (C-1) da dunniona. Em seguida, essa cadeia lateral é estendida, com a adição de uma unidade de malonil-CoA e posterior descarboxilação, como na formação da cadeia dos ácidos graxos. A hidrólise do éster leva ao  $\beta$ -cetoácido, que sofreria descarboxilação, formando a substância allagophyllona.

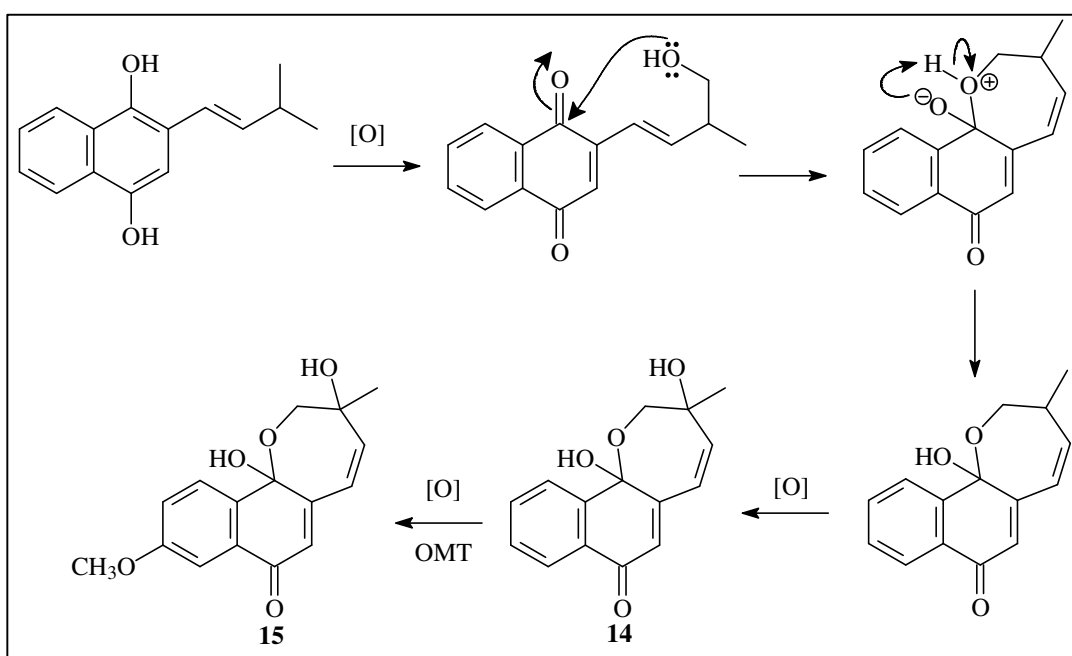
Aggregatinas já foram isoladas de outra espécie do gênero *Sinningia*, *S. aggregata* (VERDAN, 2011), e considerando a biossíntese proposta naquele trabalho, foi sugerida a rota biossintética para as substâncias **14** e **15** (Figura 24 – página 116). O primeiro passo seria a oxidação de uma das metilas do grupo prenila, formando um álcool, seguido de uma reação intramolecular de adição nucleofílica entre o álcool e a carbonila da cetona, gerando um hemi-cetal cíclico. Uma nova oxidação, agora no carbono terciário 3' completaria a formação da aggregatina E e, posterior oxidação, seguida de metilação formaria a 6-metoxiaggregatina E.



**Figura 22** – Formação dos possíveis precursores da biossíntese de 13, 14 e 15  
(DEWICK, 2001)



**Figura 23** – Proposta de biosíntese de 13

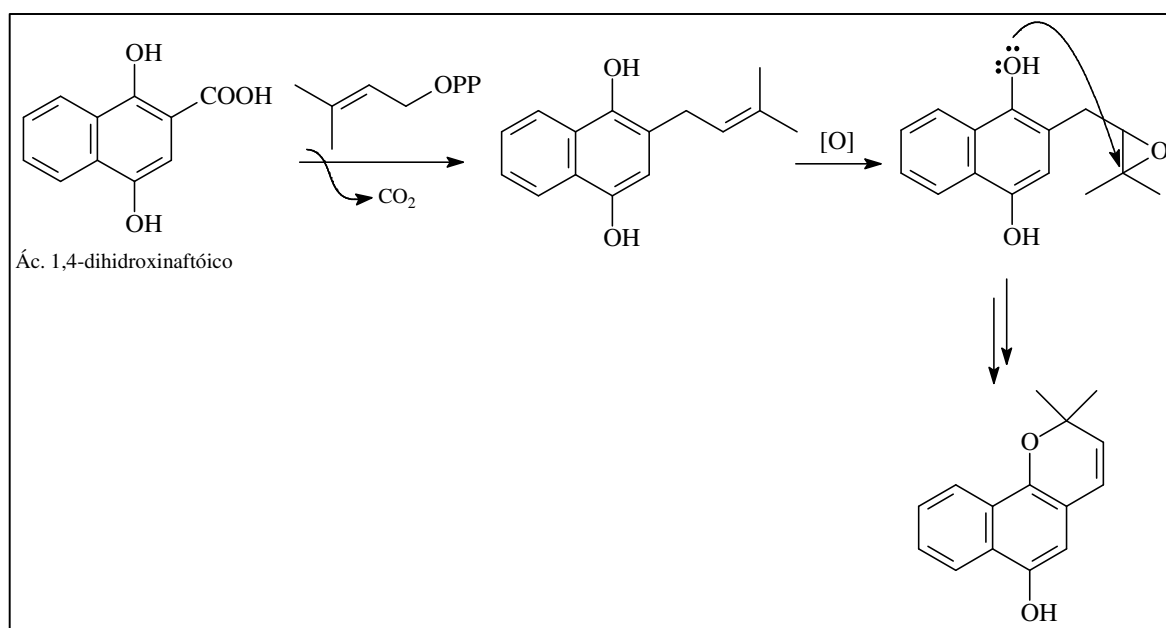


**Figura 24** – Proposta de biosíntese de 14 e 15

## 4.2. Cromenos

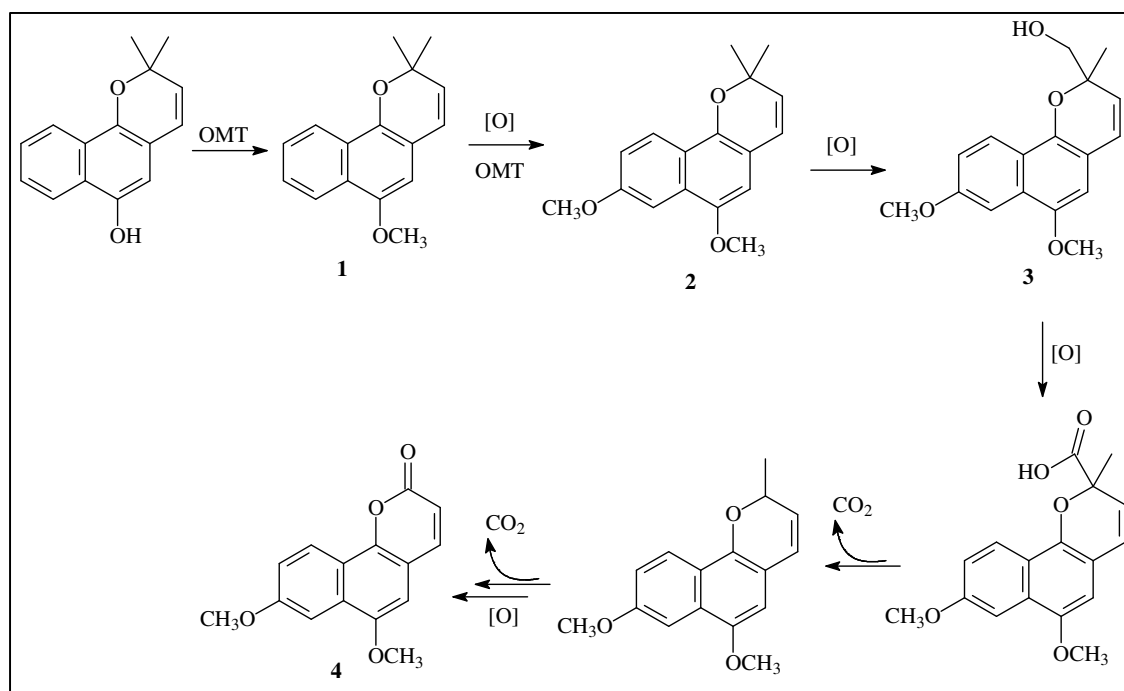
Cromenos (também conhecidos como benzopiranos) são compostos orgânicos heterocíclicos, biogeneticamente formados pela combinação de uma unidade de acetato a um sistema fenólico (via do acetato) ou também podem ser formados pela via do chiquimato (SALAZAR, 2005).

A biossíntese dos cromenos isolados começaria da mesma forma que as quinonas (Figura 22 – página 115), formando o ácido 1,4-dihidroxinaftóico que, sofreria descarboxilação, seguida de alquilação do grupo prenil, formando 1,4-diidroxi-2-prenilnaftaleno. A ciclização do grupo prenil, em um anel pirano, formaria a o precursor das substâncias **1- 7** (Figura 25 – página 117). A metilação da hidroxila resulta na formação do lapachenol (**1**), substância já conhecida na literatura e, a partir deste se formam as demais substâncias (Figura 26 – página 118).

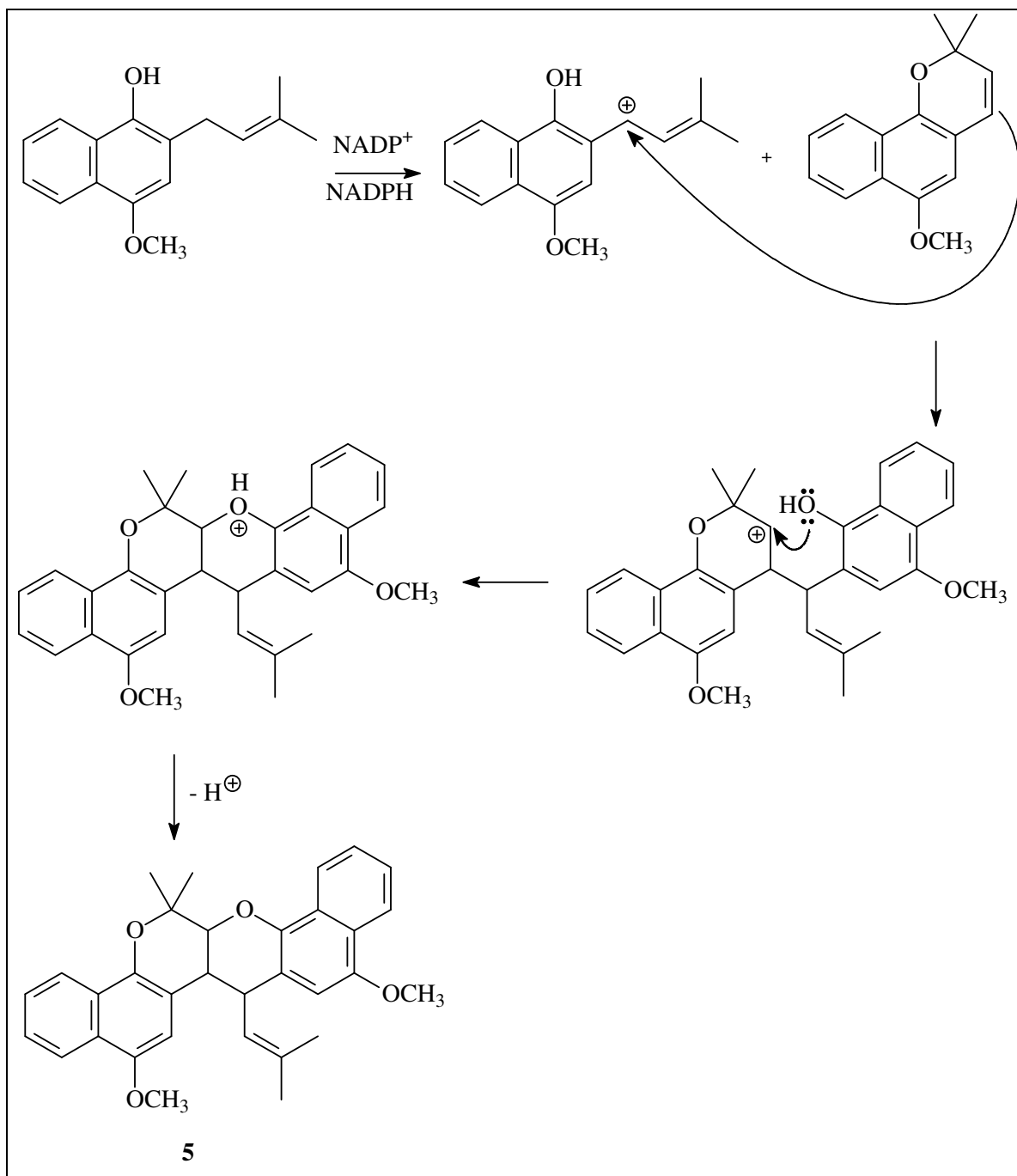


**Figura 25** – Formação do possível precursor biossintético das substâncias **1-7**

Na biossíntese de **2** ocorre oxidação e posterior metilação da hidroxila. Para formar a substância **3** ocorre oxidação da metila da posição doze. Reações de oxidação seguidas de descarboxilação originam a substância **4** (Figura 26 – página 118). As substâncias **5, 6 e 7** parecem ter se originado através de reações de adição à ligação dupla, formando substâncias diméricas (Figuras 27-28 – páginas 119-120).

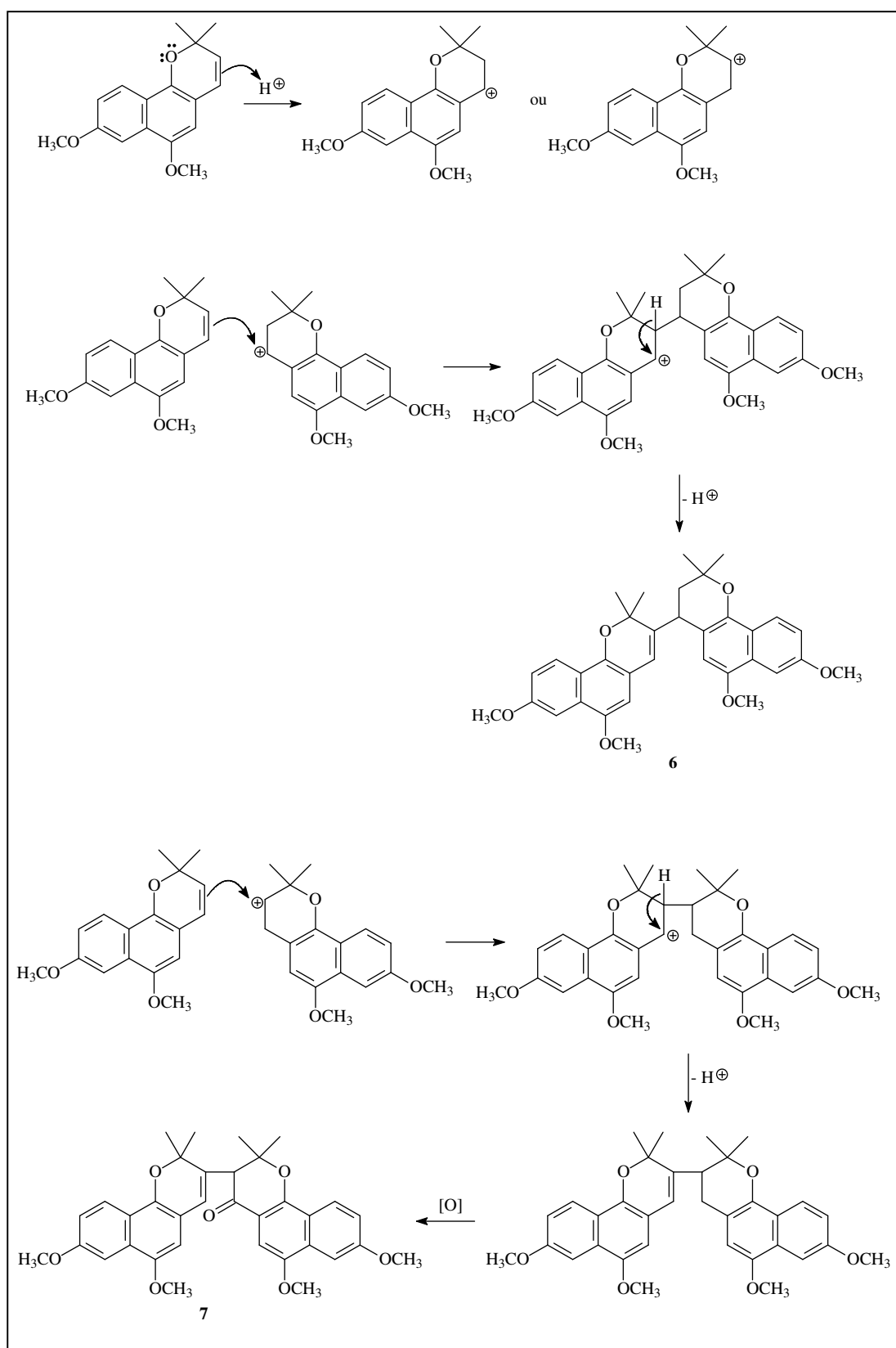


**Figura 26** – Proposta de biossíntese para as substâncias **1**, **2**, **3** e **4**



**Figura 27** – Proposta de biossíntese para a substância **5**





**Figura 28** – Proposta de biossíntese para as substâncias **6** e **7**

## 5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 5.1. Avaliação da atividade antiproliferativa

#### 5.1.1. Materiais e métodos

O extrato etanólico dos tubérculos de *S. allagophylla*, as frações obtidas por partição e as substâncias isoladas foram avaliadas *in vitro* contra dez linhagens de células tumorais humanas: U251 (glioma, SNC), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon) e K562 (leucemia). Também foi avaliada a atividade contra a linhagem de células normais VERO (rim, macaco verde). As amostras foram testadas em diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25,0 e 250,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , solução em 0,1% de DMSO em água) a 37 °C, com 5% de  $\text{CO}_2$  para cada linhagem de células. Após 48 h de incubação, foi adicionada uma solução de ácido tricloroacético (50%) e a mistura foi deixada 30 min a 4 °C. Após esse tempo, as células foram lavadas e secadas. A proliferação celular foi determinada pela quantificação espectrofotométrica (540 nm) do teor de proteína celular usando sulforrodamina B (SKEHAN *et al.*, 1990). A atividade foi expressa como a concentração capaz de causar inibição total do crescimento celular (TGI – *total growth inhibition*). Utilizou-se doxorrubicina, um medicamento utilizado no tratamento do câncer, como controle positivo e o solvente como controle negativo. Os dados foram analisados pela ANOVA e o Teste F foi utilizado para determinar anomalias entre os grupos. Os testes foram realizados no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP), sob a responsabilidade do Dr. João Ernesto de Carvalho.

#### 5.1.2. Resultados e discussão

Os resultados da atividade antiproliferativa estão mostrados na Tabela 22 – página 123. Pode-se notar que o extrato etanólico bruto foi ativo principalmente contra células de leucemia (K562, TGI 5,13  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Também apresentou atividade contra células de mama (MCF-7), melanoma (UACC-62) e ovário-resistente (NCI-ADR/ Res), com valores de TGI entre 99,06 e 127,04  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em relação a outras linhagens de células, os valores de TGI foram muito elevados e o extrato pode ser considerado inativo.

Dentre as frações obtidas por partição, a maior atividade foi observada na fração **SA-1**, resultante da extração com hexano. Essa fração inibiu seis linhagens de células com valores de TGI variando de 15,5 a 32,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo muito mais ativa que o extrato em etanol. Além disso, apresentou baixa citotoxicidade contra células normais, com TGI > 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em comparação, as frações em diclorometano (**SA-2**), acetato de etila (**SA-3**) e 1-butanol (**SA-4**) inibiram o crescimento de um número menor de linhagens de células com valores maiores de TGI.

Da fração hexânica foram testadas três substâncias isoladas. A substância lapachenol (**1**) apresentou atividade somente contra três linhagens: glioma SNC (U251, TGI 42,09  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), colorretal (HT-29, TGI 130,72) e leucemia (K562, TGI 13,66). Apesar desse resultado, existe um relato na literatura de que esta substância é útil na prevenção do câncer (ITOIGAWA *et al.*, 2001). O principal constituinte da fração ativa foi a substância inédita, identificada como 8-metoxilapachenol (**2**). Esta foi testada, mas apresentou baixa atividade, tendo inibido o crescimento de uma única linhagem de célula (HT-29) com um valor de TGI mais elevado do que aquele apresentado pela fração. A substância dunniol (**9**), uma naftoquinona presente em menor quantidade na fração, apresentou significativa atividade contra seis linhagens de células. As células de leucemia (K562) foram as mais susceptíveis a esta substância, com um valor de TGI de 1,14  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As células de glioma SNC (U251, TGI 4,84), mama (MCF-7, TGI 5,28), ovário resistente (NCI-ADR/RES, TGI 2,95), ovário (OVCAR-3, TGI 6,88) e rim (VERO, TGI 9,47) também tiveram seu crescimento inibido, porém em concentrações maiores. Não foram encontrados na literatura relatos de atividade antiproliferativa para a substância dunniol, mas substâncias da mesma classe (quinona) apresentam atividade significativa (ROCHA, *et al.*, 2011).

Para as substâncias puras testadas foi calculado o TGI em  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Tabela 23 – página 124). Foi observado que a substância **9** (dunniol), apresentou toxicidade muito menor (39  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) que o padrão doxorrubicina (0,16  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Estes resultados foram publicados na revista Química Nova (RIVA *et al.*, 2012).

**Tabela 22** – Atividade antiproliferativa do extrato etanólico, frações e substâncias de *S. allagophylla*

Linhagem de célula	TGI ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )								padrão
	EESAL	SA-1	SA-2	SA-3	SA-4	1	2	9	
U251	-	32,7	>250,0	117,9	>250,0	42,09	>50	4,84	0,03
UACC-62	103,96	-	-	-	-	-	>50	-	0,72
MCF-7	99,06	30,4	76,6	69,8	149,7	>250	-	5,28	0,06
NCI-ADR/RES	127,04	>250,0	250,0	>250,0	121,4	>250	>50	2,95	0,92
786-0	>250	27,5	74,2	167,2	>250,0	>250	>50	>250	0,09
NCI-H460	230,3	26,3	>250,0	202,8	>250,0	>250	>50	>250	0,01
PC-3	180,67	142,0	111,2	41,2	>250,0	>250	>50	>250	0,13
OVCAR-3	>250	-	-	-	-	>250	>50	6,88	0,40
HT-29	>250	15,6	43,2	23,4	105,7	130,72	26,74	>250	0,30
K562	5,13	15,5	>250,0	>250,0	>250,0	13,66	>50	1,14	0,08
VERO	-	>250,0	42,4	124,5	>250,0	>250	>50	9,47	0,09

-: não testado; TGI: concentração que causa inibição total do crescimento celular; U251: glioma SNC; UACC-62: melanoma; MCF-7: mama; NCI-ADR/RES: ovário resistente a múltiplos fármacos; 786-0: rim; NCI-H460: pulmão, células não pequenas; PC-3: próstata; OVCAR-3: ovário; HT-29: colorretal; K562: leucemia; VERO: rim, célula normal; **SA-1**: fração em hexano; **SA-2**: fração em diclorometano; **SA-3**: fração em acetato de etila; **SA-4**: fração em 1-butanol; **1**: lapachenol; **2**: 8-metoxilapachenol; **9**: dunniol; padrão: doxorrubicina.

**Tabela 23** – Atividade antiproliferativa (TGI em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) das substâncias isoladas **1**, **2** e **9**

Linhagem de células	TGI ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>Padrão</b>
Glioma	170	> 180	20	0,05
Melanoma	-	> 180	-	1,3
Mama	> 1000	-	22	0,11
Ovário res.	> 1000	> 180	12	1,7
Rim	> 1000	> 180	> 1000	0,16
Pulmão	> 1000	> 180	> 1000	0,02
Próstata	> 1000	> 180	> 1000	0,24
Ovário	> 1000	> 180	28	0,74
Colorretal	540	97	> 1000	0,55
Leucemia	57	> 180	4,5	0,15
Normal	> 1000	> 180	39	0,16

## 5.2. Avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória

### 5.2.1. Materiais e métodos

Os ensaios *in vivo* de atividade anti-inflamatória e analgésica foram conduzidos em camundongos Swiss machos (25-35 g), mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, em temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e umidade controlada (60-80%), ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas com os protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná.

Foram utilizadas diferentes concentrações de extrato etanólico, frações obtidas por partição e da substância pura **2** (amostras). A atividade analgésica foi avaliada pelo teste de formalina (HUNSKAAR *et al.*, 1987), pelo teste da placa aquecida (MORI *et al.*, 2011), e pelo teste de alodinia mecânica (MORI *et al.*, 2011).

O teste de formalina consiste na injeção intraplantar de uma solução de formalina 1%. Os animais foram colocados em uma câmara de observação por 20 min para se habituarem ao ambiente. Em seguida, receberam o tratamento com as diferentes amostras por via oral, 60 min antes da administração da formalina. Como controle positivo foi utilizada indometacina  $2 \text{ mg kg}^{-1}$ . Animais controles receberam somente o veículo. Decorrido este tempo, os animais receberam uma injeção na pata traseira direita de formalina e, o tempo que os animais apresentaram o comportamento nociceptivo de levantar ou sacudir a pata injetada (em segundos) foi avaliado em blocos de 5 min durante 30 min.

Para o teste da placa aquecida, o limiar nociceptivo dos animais foi avaliado através da colocação dos animais sob uma placa aquecida à 54 °C. Somente os animais que apresentaram comportamento nociceptivo (lamber das patas dianteiras ou traseiras) em menos de 10 s foram selecionados para o teste. Estes foram tratados com diferentes doses das amostras ou fentanil ( $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ , controle positivo) e submetidos novamente à placa quente 30, 60, 120 e 360 min após o tratamento para avaliar o limiar nociceptivo. O tempo máximo de permanência na placa para cada animal (tempo de corte) foi de 30 s. Este tempo é descrito na literatura como um tempo seguro para que não haja danos à pata do animal na temperatura utilizada.

O limiar mecânico foi medido utilizando-se o paradigma acima-abaxo, descrito previamente por Chaplan (CHAPLAN *et al.*, 1994). Os camundongos foram aclimatizados por

1-2h em caixas transparentes individuais em uma plataforma elevada com uma rede metálica no piso a fim de permitir o acesso à superfície plantar das patas traseiras. Filamentos de Von Frey de diferentes espessuras (0,008-6,0 g) foram aplicados à mesma porção da pata traseira antes do tratamento com o extrato, frações ou substâncias puras ou indometacina (controle positivo) e diversas vezes após a aplicação de carragenina (300 µg/20µl). A alodinia mecânica foi considerada como uma diminuição do limiar quando comparado com a mesma pata antes da injeção do estímulo. Cada seção de teste consistiu de grupos de seis estimulações com filamentos de espessura crescente.

A atividade anti-inflamatória foi realizada através do teste de edema de pata (KASSUYA *et al.*, 2009). A espessura da pata foi medida antes e após a indução do edema utilizando um micrômetro (Mitutoyo Serie 293) a cada hora por 6 h. O edema foi induzido na pata direita do animal através da aplicação de carragenina (300 µg/pata) em 20 µL e salina na pata esquerda. O controle positivo foi indometacina (2 mg kg<sup>-1</sup>).

Em complemento aos testes descritos acima também foi avaliado o efeito sobre o desempenho motor (“rota-rod”). Esta avaliação permite uma interpretação mais acurada dos resultados obtidos nos testes para determinação da atividade analgésica, uma vez que os testes descritos acima se baseiam em um desempenho motor adequado. O desempenho motor do animal foi realizado em aparelho “rota-rod” (mod. DS 37; Ugo Basille). Foi computado o tempo basal de permanência (em segundos) dos camundongos em uma barra giratória de, no máximo, 2 minutos (tempo de corte). Os animais foram tratados com os extratos, frações e substâncias isoladas e o comportamento motor avaliado posteriormente em diferentes tempos.

Os dados foram analisados para significância estatística por ANOVA ONE-WAY seguida de teste de Bonferroni para as comparações múltiplas. O nível de significância considerado foi de 5%.

Todos os experimentos foram realizados no laboratório de Farmacologia da dor e inflamação, do Departamento de Farmacologia da UFPR, sob a coordenação do Prof. Aleksander Roberto Zamprônio.

### 5.2.2. Resultados e discussão

As partes aéreas de *S. allagophylla* (folhas, flores) são consideradas úteis na medicina popular para o tratamento de febre (GOMES e SHEPHERD, 2000). Entretanto os

protocolos aceitos para a avaliação de atividade antitérmica exigem grande quantidade de material, nem sempre disponível quando se trata de produtos naturais. Considerando que fármacos antitérmicos frequentemente apresentam também atividade analgésica e anti-inflamatória, nós optamos por testar estas atividades que exigem menor quantidade de material. Pela mesma razão, foram utilizados os tubérculos, que fornecem maior massa, evitando o corte de um grande número de exemplares.

Inicialmente foi utilizado o teste de edema para avaliar as frações obtidas por partição: **SA-1** (hexano), **SA-2** (diclorometano), **SA-3** (acetato de etila) e **SA-4** (1-butanol). Neste ensaio todas as frações apresentaram alguma atividade, sugerindo que este fracionamento não foi eficiente para concentrar os princípios ativos. Aparentemente estes se distribuíram pelas quatro frações.

Uma nova partição foi realizada, obtendo-se apenas duas frações: uma contendo os constituintes menos polares (fração em éter de petróleo) e outra com os mais polares (fração metanólica). Os testes de edema foram repetidos com estas duas frações e, desta vez, a atividade ficou concentrada na fração em éter de petróleo. O principal constituinte desta fração era **2** (8-metoxilapachenol) que foi avaliado nos diferentes modelos de dor, no modelo de inflamação e no teste de atividade motora. A substância **2** mostrou atividade analgésica e anti-inflamatória, sem afetar a atividade motora dos animais, na concentração de  $1,8 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $6,7 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ ), quando administrada por via oral. Estes resultados já foram publicados (BARBOSA *et al.*, 2013).

### 5.3. Avaliação da atividade larvícida

#### 5.3.1. Materiais e métodos

Os bioensaios de atividade larvícida seguiram o protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981 [a, b]), com ligeiras modificações (ACIOLE, 2009). O teste preliminar da atividade larvícida foi realizado com a substância **2** (8-metoxilapachenol).

As larvas foram obtidas a partir de ovos da colônia “Rockefeller-CDC (Center of Disease Control), os quais foram submersos em copos plásticos com capacidade para 770 mL. Foi adicionado 0,026 g de ração Purina® Cat Chow® triturada para induzir a eclosão larval. Após observação da eclosão larval, mediante visualização das larvas nadando na água desclorada dentro de copos, e passadas 24 horas, estas foram transferidas para bandejas plásticas (35,5 cm x 21,5 cm x 6,5 cm) contendo 3000 mL de água também



desclorada. Estas larvas foram mantidas sob condições de temperatura ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) e fotoperíodo (12:12) controlados em câmara climatizada modelo 347 CDG. Assim permaneceram até atingirem o estágio larval de 3º instar ou 4º inicial. Não sofreram nenhum tipo de tratamento químico, porém foram alimentadas com a mesma ração supra citada.

Atingindo o estágio larval descrito anteriormente, as larvas foram contadas, separadas e transferidas, com auxílio de pipeta de Pauster, para copos plásticos descartáveis de capacidade 50 mL contendo 10 mL da mesma água desclorada, totalizando 20 larvas para cada copo.

Foram preparadas soluções com diferentes concentrações da substância **2**, que foi dissolvida em DMSO (1%) e aferida com água desclorada. Em copos plásticos com capacidade de 330 mL foi colocado 190 mL da solução contendo a substância **2** e os 10 mL da água desclorada contendo as 20 larvas. As concentrações da substância **2** testadas foram de 13,1, 5,0, 1,0 e 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O bioensaio foi realizado em quadruplicata. Para o tratamento controle, uma parcela das larvas foi exposta apenas a DMSO 1% em água. As larvas foram mantidas sob condições de temperatura ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), umidade ( $70\% \pm 10$ ) em câmara climatizada modelo 347 CDG.

A mortalidade das larvas foi verificada após 24 horas, e então foi adicionado 20 mg por copo de ração Purina® Cat Chow® triturada. Após 48 horas uma nova leitura foi realizada. Larvas incapazes de atingir a superfície da água ou imóveis quando submetidas a estímulos (batidas sucessivas na parede dos copos com pipeta de Pauster) foram consideradas como larvas mortas (WHO, 1981 [a, b]).

A estimativa das concentrações capazes de ocasionar mortalidade de 50% ( $\text{CL}_{50}$ ), 95% ( $\text{CL}_{95}$ ) e 99% ( $\text{CL}_{99}$ ) das larvas foram determinadas com o auxílio do software *OriginPro* 6.1 (SAM, 1993).

Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) da Universidade Federal do Paraná, coordenado pelo Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva.

### 5.3.2. Resultados e discussão

As plantas são fontes importantes de substâncias bioativas com estruturas químicas diferentes e com diversas atividades contra insetos. O estudo de produtos naturais obtidos de plantas com atividade larvicida contra *Aedes aegypti* é recente, sendo encontrados

trabalhos realizados com o intuito de isolar e caracterizar tais substâncias bioativas a partir da década de 1980 (GARCEZ *et al.*, 2013). Na literatura foram encontrados registros de várias classes de substâncias apresentando atividade larvica, incluindo quinonas, amidas, limonoides, cumarinas, terpenos, lactonas, alcaloides e cromenos (KISHORE *et al.*, 2011; CABRAL *et al.*, 2009). Considerando essas informações e, o isolamento de grande quantidade da substância **2**, esta foi selecionada para ser avaliada contra larvas de *Aedes aegypti*.

Foram testadas quatro concentrações diferentes desta substância. O percentual de larvas mortas nestas diferentes concentrações permitiu determinar os valores de CL<sub>50</sub>, CL<sub>95</sub> e CL<sub>99</sub> nos tempos de 24 e 48 horas. A atividade larvica contra as larvas de *Aedes aegypti* está demonstrada na Tabela 24 – página 129.

**Tabela 24** – Atividade larvica da substância isolada **2**

8-metoxilapachenol		CL ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	CL ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
24 horas	CL <sub>50</sub>	7,41	27,4
	CL <sub>95</sub>	12,30	45,5
	CL <sub>99</sub>	13,18	48,8
48 horas	CL <sub>50</sub>	5,25	19,4
	CL <sub>95</sub>	12,30	45,5
	CL <sub>99</sub>	13,18	48,8

Foi observado que a concentração letal (CL<sub>50</sub>) num tempo de 24 horas foi de 7,41  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e após 48 horas foi de 5,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . De acordo com a literatura (CHENG *et al.*, 2003), substâncias com valores de CL<sub>50</sub> inferiores a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  são considerados bons agentes larvicidas.

Resultados significativos vêm sendo obtidos nos trabalhos que visam à busca de substâncias de origem vegetal com atividade larvica contra *Aedes aegypti*. A CL<sub>50</sub> relatada para os cromenos (benzopiranos) 6-isobutiril-5,7-dimetoxi-2,2-dimetilbenzopirano (HP1), 7-hidroxi-6-isobutiril-5-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP2) e 5-hidroxi-6-isobutiril-7-metoxi-2,2-dimetilbenzopirano (HP3) foram respectivamente 3,4, 34 e 41,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (SILVA *et al.*, 2013). HP2 e HP3 apresentaram valores de CL<sub>50</sub> superiores ao cromeno (**2**) testado nesta pesquisa, enquanto que HP1 apresentou valor próximo.

A simplicidade estrutural de 8-metoxilapachenol, não apresentando estereocentros em sua estrutura, facilita a sua obtenção por síntese orgânica, e a preparação de derivados que podem ser mais potentes e úteis para o controle de larvas de *Aedes aegypti*.

## 6. CONCLUSÃO

Dos tubérculos de *Sinningia allagophylla* foram isoladas e identificadas, 23 substâncias, das quais 9 são inéditas na literatura. Estas substâncias pertencem a diversas classes químicas. Da classe dos cromenos foram isoladas as substâncias lapachenol (1), 8-metoxilapachenol (2), 8-metoxi-12-hidroxilapachenol (3) e allagophyllolídeo (4), além de três cromenos diméricos, denominados allagophyllina A (5), allagophyllina B (6) e allagophyllina C (7). Também foram isoladas 8 quinonas, sendo uma delas a antraquinona, tectoquinona (8), quatro naftoquinonas: dunniol (9),  $\alpha$ -dunniona (10), 8-hidroxidunniona (11) e dunniona (12) e 3 hidronaftoquinonas: allagophyllona (13), aggregatina E (14) e 6-metoxiaggregatina E (15). Um iridoide, conhecido como halleridona (16), os sesquiterpenos cedrol (17),  $\alpha$ -muurolol (18) e 8-cedren-13-ol (19) e, finalmente os esteroides oleato de sitosterila (20), linoleato de sitosterila (21), oleato de estigmasterila (22) e linoleato de estigmasterila (23). Isto demonstra que esta espécie apresenta uma considerável diversidade química.

Os ensaios biológicos realizados com o extrato etanólico, frações e substâncias isoladas evidenciaram que *S. allagophylla* apresenta substâncias com diferentes atividades biológicas. A naftoquinona dunniol foi identificada como a substância responsável pela atividade antiproliferativa observada no extrato etanólico. Também foi descoberto um novo cromeno, 8-metoxilapachenol, com atividade analgésica, anti-inflamatória e larvicida.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIOLE, S. D. G. Avaliação da atividade inseticida dos óleos essenciais das plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e da Mata Atlântica Myrtaceae como alternativa de controle às larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera; Culicidae). Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Lisboa, 2009.
- ARAUJO, A. O.; SOUZA, V. C.; CHAUTEMS, A. Gesneriaceae da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Bras. Bot.*, **28**, 109-135, 2005.

- ARAUJO, A. O. e CHAUTEMS, A. Gesneriaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico, RJ. (2014). <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB119>, acesso em 08/01/2014.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography, mass spectroscopy. 4 ed., Carol Stream: Allured, 804pp., 2007.
- BARBOSA, F. L.; MORI, L. S.; RIVA, D.; STEFANELLO, M. E. A.; ZAMPRONIO, A. R. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and 8-methoxylapachenol from *Sinningia allagopphylla* tubers. *Basic Clin. Pharmacol.Toxicol.*, **113**, 1-7, 2013.
- BARRERO, F. A.; MORAL, J. Q.; LARA, A. Sesquiterpenes from *Juniperus thurifera* L. Stereochemistry in usual cedrane and duprezianane series. *Tetrahedron*, **56**, 3717-3723, 2000.
- BELLAKHDAR, J.; TORRE, M. C.; RODRIGUEZ, B.; SAVONA, G.; BRUNO, M.; PIOZZI, F. Halleridone and Related Products from *Teucrium decipiens*. *Planta Med.*, **54**, 267, 1988.
- BOGGAN, J. e SHALIT, P. What is a Gesneriad?. *Gesneriads*, **56**, 14-21, 2006.
- BROWN, G. D.; LIANG, G. Y.; SY, L.K. Terpenoids from the seeds of *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, **64**, 303-323, 2003.
- CABRAL, M. M. O.; ALENCAR, J. A.; GUIMARÃES, A. E.; KATO, M. J. Larvicidal activity of grandisin against *Aedes aegypti*. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.*, **25**, 103-105, 2009.
- CAI, X-H.; LUO, X-D.; ZHOU, J.; HAO, X-J. Quinones from *Chirita eburnea*. *J. Nat. Prod.*, **68**, 797-799, 2005.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America – A personal view. *J. Ethnopharmacol.*, **100**, 131-134, 2005.
- CHAPLAN, S.R.; BACH, F.W.; POGREL, J.W.; CHUNG, J.M.; YAKSH, T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosc. Methods*, **53**, 55-63, 1994.
- CHAUTEMS, A. *Gesneriaceae*, In: Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, FAPESP, v. 3, pp 75-100, 2003.
- CHAUTEMS, A.; LOPES, T. C. L.; PEIXOTO, M.; ROSSINI, J. Taxonomic revision of *Sinningia* Nees (Gesneriaceae) IV: six new species from Brazil and a long overlooked taxon. *Candollea*, **65**, 241-266, 2010.
- CHAVES, M. H.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D.; COSTA, D. A.; OLIVEIRA, C. A.; COSTA, A. F.; BRITO-JUNIOR, F. E. M. Fenóis totais, atividade antioxidante e

- constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **20**, 106 – 112, 2010.
- CHENG, S. S.; CHANG, H. T.; CHANG, S. T.; TSAI, K. H.; CHEN, W. J. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technol.*, **89**, 99-102, 2003.
  - COOKE, R. G.; GHISALBERTI, E. L.; JOHNSON, B. L.; RASTON, C. L.; SKELTON, B. W.; WHITE, A. H. Absolute configurations of naturally occurring quinones: ventilagone and dunnione. *Aust. J. Chem.*, **59**, 925-930, 2006.
  - COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente as larvas do *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **15**, 304-309, 2005.
  - COSTA, E. A.; LINO, R.C.; GOMES, M. N.; NASCIMENTO, M.V. M.; FLORENTINO, I. F.; GALDINO, P. M.; ANDRADE, C. H.; REZENDE, K. R.; MAGALHÃES, L. O.; MENEGATTI, R. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of LQFM002 – A 4-nerolidylcatechol derivative. *Life Sci.*, **92**, 237-244, 2013.
  - COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A contribuição dos Produtos Naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Virtual Quim.*, **2**, 47-58, 2010.
  - CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 3670-3695, 2013.
  - DALMARCO, J. B. Estudo das propriedades químicas e biológicas de *Rosmarinus officinalis* L. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
  - DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach. 2 ed., Wiley, 507pp., 2001.
  - DHAMIJA, I.; KUMAR, N.; MANJULA, S. N.; PARIHAR, V.; SETTY, M. M.; PAI, K. S. R. Preliminary evaluation of *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* antitumor activity of *Premna herbácea* Roxb. In Ehrlich ascites carcinoma model and Dalton's lymphoma ascite model. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **65**, 235-242, 2013.
  - DUFFY, R.; WADE, C.; CHANG, R. Discovery of anticancer drugs from antimalarial natural products: a MEDLINE literature review. *Drug Discov. Today*, **17**, 943-953, 2012.

- FAVACHO, H. A. S. Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do óleo fixo de *Euterpe oleracea* Mart. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto da Saúde da Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.
- FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. *Quim. Nova*, **36**, 1605-1609, 2013.
- GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L.M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. *Rev. Virtual Quim.*, **5**, 363-393, 2013.
- GASPARINO, E. C., Palinotaxonomia de espécies brasileiras de Gesneriaceae, com ênfase nas ocorrentes no Estado de São Paulo. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.
- GOMES, M. A. N.; SHEPHERD, S. L. K. Estudo de Nutrição Mineral *in vitro* relacionado a adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de Cerrado. *Revta Brasil. Bot.*, **23**, 153-159, 2000.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalina test in mice-dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. *Pain*, **30**, 103-114, 1987.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, disponível em [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br) – acesso em 09 de jan. de 2014.
- INOUE, K.; UEDA, S.; NAYESHIRO, H.; INOUE, H. Structures of usually prenylated naphthoquinones of *Streptocarpus dunni* and its cell cultures. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2265-2268, 1982.
- INOUE, K.; UEDA, S.; NAYESHIRO, H.; INOUE, H. Quinones of *Streptocarpus dunni*. *Phytochemistry*, **3**, 737-741, 1983.
- INOUE, K.; UEDA, S.; NAYESHIRO, H.; MORITOME, N.; INOUE, H. Biosynthesis of naphthoquinones and anthraquinones in *Streptocarpus dunnii* cell cultures. *Phytochemistry*, **23**, 313-318, 1984.
- ITOIGAWA, M.; ITO, C.; TAN, H. T. W.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Cancer chemiopreventive activity of naphthoquinones and their analogs from *Avicennia* plants. *Cancer Lett.*, **174**, 135-139, 2001.
- KASSUYA, C.A.; CREMONEZE, A.; BARROS, L.F.; SIMAS, A.S.; LAPA, F.R.; MELLO-SILVA, R.; STEFANELLO, M.E.; ZAMPRONIO, A.R. Antipyretic and anti-inflammatory

- properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). *J. Ethnopharmacol.*, **124**, 369-376, 2009.
- KHAMBAY, B. P. S.; BATTY, D.; CAHILL, M.; DENHOLM, I. Isolation, characterization, and biological activity of naphthoquinones from *Calceolaria andina* L. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 770-775, 1999.
  - KHAZIR, J.; MIR, B. A.; PILCHER, L.; RILEY, D. L. Role of plants in anticancer drug Discovery. *Phytochem. Lett.*, **7**, 173-181, 2014.
  - KISHORE, N.; MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K.; TRIPATHI, V. A review on natural products with mosquitosidal potentials. Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry, Research Signpost, 335-365, 2011.
  - MACARI, P. A. T.; EMERENCIANO, V. P.; FERREIRA, Z. M. G. S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicanstriana* através de análise por microcomputador. *Quim. Nova*, **13**, 260-262, 1990.
  - MESSANA, I.; SPERANDEI, M.; MULTARI, G.; GALEFFI, C.; MARINI BETTOLO, G. B. A Cyclohexadienone and a Cyclohexenone from *Halleria lúcida*. *Phytochemistry*, **23**, 2617-2619, 1984.
  - MOREIRA, R. Y. O.; ARRUDA, M. S. P.; ARRUDA, A. C.; SANTOS, L. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; TEREZO, E.; Antraquinonas e naftoquinonas do caule de um espécime de reflorestamento de *Tectona grandis* (Verbenaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, **16**, 392-396, 2006.
  - MORI, L.S.; BOLLER, S.; KASSUYA, C.A.L.; STEFANELLO, M.E.A.; ZAMPRONIO, A.R. Analgesic effects of the ethanolic extract from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae) trunk bark and of N-acetylxylopinine, a semi-synthetic analogue of xylopinine. *Phytomedicine*, **18**, 143-147, 2011.
  - MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. *Medicinal Plants of Brazil*, Reference Publications Inc., Michigan, p. 181, 2000.
  - NAVARRO, S. A.; SERAFIM, K. G. G.; MIZOKAMI, S. S.; HOHMANN, M. S. N.; CASAGRANDE, R.; VERRI JR, W. A. Analgesic activity of piracetam: Effect on cytokine production and oxidative stress. *Pharmacol, Biochem. Be.*, **105**, 183-192, 2013.
  - OCHWANG'I, D. O.; KIMWELE, C. N.; ODUMA, J. A.; GATHUMBI, P. K.; MBARIA, J. M.; KIAMA, S. G. Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega Contry, Kenya. *J. Ethnopharmacol.*, **151**, 1040-1055, 2014.
  - PIRES, P. A. Potencial analgésico, anti-edematogênico, antipirético e atividade ulcerogênica de fármacos anti-inflamatórios em roedores. Dissertação de mestrado

apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

- PUGACHEV, K. V.; GUIRAKHOO, F.; TRENT, D. W.; MONATH, T. P. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *Inter. J. Parasitol.*, **33**, 567-582, 2003.
- RAMKUMAR, K.; SHARMA, S.; VASUDEVA, N.; KUMAR, S. *In vivo* anti-inflammatory potential of various extracts of *Sida tiagii Bhandari*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 947-952, 2012.
- REIBENSPIES, J. H.; WILLAMS, H. J.; ORTIZ, C.; SCOTT, A. I. Crystal and molecular structure of lapachenole. *J. Cryst. Spec. Res.*, **19**, 597-602, 1989.
- RIVA, D.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A.; POLIQUESI, C. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; SALVADOR, M. J. Estudo químico de *Sinningia allagophylla* guiado por testes de atividade antiproliferativa. *Quim. Nova*, **35**, 974-977, 2012.
- ROCHA, D. R.; SOUZA, A. C. G.; RESENDE, J. A. L. C.; SANTOS, W. C.; SANTOS, E. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; FERREIRA, V. F. Synthesis of new 9-hydroxy- $\alpha$ - and 7-hydroxy- $\beta$ -pyran naphtoquinones and cytotoxicity against câncer cell lines. *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 4315-4322, 2011.
- SALAZAR, K. J. M.; PAREDES, G. E. D.; LLUNCOR, L. R.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. *Phytochemistry*, **66**, 573-579, 2005.
- SAM, T. W. Toxicity testinh using the brime shrimp: *Artemia salina*. In: COLEGATE, S. M. e MOLYNEUX. *Bioactive Natural Products*, RJ, CRC, Boca Raton, 1993.
- SANTIAGO, G. M. P.; VIANA, F. A.; PESSOA, O. D. L.; SANTOS, R. P.; POULIQUEN, Y. B. M.; ARRIAGA, A. M. C.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **15**, 187-190, 2005.
- SHIMADA, Y.; HIROTA, Y.; BABA, T.; MORIYAMA, S.; TOMINAGA, Y.; TERA, T. Enzymatic synthesis of steryl esters of polyunsaturated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76**, 713-716, 1999.
- SILVA, A.M.S.; PINTO, D.C.G.A. Structure elucidation of xanthone derivatives: studies of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Curr. Med. Chem.*, **12**, 2481-2497, 2005.
- SILVA, O. S.; SILVA, F. C.; BARROS, F. M. C.; SILVA, J. L. R.; BORDIGNON, S. A. L.; EIFLER-LIMA, V. L.; POSER, G. L.; PROPHIRO, J. S. Larvicidal and growth-inhibiting



- activities of extract and benzopyrans from *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Ind. Crop. Prod.*, **45**, 236-239, 2013.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1107-1112, 1990.
  - SOLOWAY, S. B. Naturally occurring insecticides. *Environ. Health. Perspect.*, **14**, 109-117, 1976.
  - SUN, X.; GAO, R. L.; XIONG, Y. K.; HUANG, Q. C.; XU, M. Antitumor and immunomodulatory effects of a water-soluble polysaccharide from *Lilii Bulbus* in mice. *Carbohydr. Polym.*, **102**, 543-549, 2014.
  - SWINNY, E.E.; BLOOR, S.J.; WONG, H. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments for the 3-deoxyanthocyanins, luteolinidin-5-glucoside and apigeninidin-5-glucoside. *Magn. Res. Chem.*, **38**, 1031-1033, 2000.
  - UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T.; MENEGUCE, B.; ASSIS, A. M. Estabelecimento de um protocolo para a propagação in vitro de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore (Gesneriaceae). *Acta Sci. Agron.*, **28**, 503-506, 2006.
  - VERDAN, M. H.; CERVI, A. C.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A. Anthraquinones and ethylcyclohexane derivatives from *Sinningia speciosa* "Fyfiana". *Biochem. Syst. Ecol.*, **37**, 40-42, 2009.
  - VERDAN, M. H.; BARISON, A.; SÁ, E. L. de; SALVADOR, M. J.; POLIQUESI, C. B.; EBERLIN, M. N.; STEFANELLO, M. E. A. Lactones and quinones from the tubers of *Sinningia aggregata*. *J. Nat. Prod.*, **73**, 1434-1437, 2010.
  - VERDAN, M. H. Constituintes químicos e atividade citotóxica dos tubérculos de *Sinningia aggregata* (Gesneriaceae). Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
  - VERDAN, M. H.; STEFANELLO, M. E. A. Secondary metabolites and biological properties of Gesneriaceae species. *Chem. Biodiv.*, **9**, 2701-2731, 2012.
  - VERDAN, M. H.; UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T.; SALVADOR, M. J.; SÁ, E. L.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A. Leucotrichoic acid, a novel sesquiterpene from *Sinningia leucotricha* (Gesneriaceae). *Tetrahedron Lett.*, **54**, 4735-4737, 2013.
  - VERRI JR, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, F. Q. C.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol. Therapeut.*, **112**, 116-138, 2006.

- VIEGAS, C. Jr.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim. Nova*, **29**, 326-337, 2006.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) [a]. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva. WHO/VB/81, 807, 1-6, 1981.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) [b]. Criteria and meaning of tests for determining the susceptibility or resistance of insects to insecticides. Geneva.